

**Molekulare Typisierung von *Echinococcus multilocularis*-  
Isolaten aus Deutschland**

**Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
„doctor rerum naturalium“ (Dr. rer. nat.)**

**vorgelegt dem Rat der Fakultät für Biowissenschaften  
der Friedrich-Schiller- Universität Jena**

**von Diplom-Biologin Mandy Herzig  
geboren am 29. April 1989 in Leisnig**

Gutachter:

1. Prof. Dr. Berit Jungnickel  
Friedrich-Schiller- Universität „Jena
2. Prof. Dr. Franz Joseph Conraths  
Friedrich-Loeffler-Institut, Greifswald
3. Prof. Dr. Arwid Dauschies  
Universität Leipzig, Leipzig

Datum der öffentlichen Verteidigung: 12. Juli 2019

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	I
Abbildungsverzeichnis .....	III
1. Zusammenfassung.....	- 1 -
2. Einleitung .....	- 4 -
2.1 Aktuelle Systematik der Echinokokken .....	- 4 -
2.2 Morphologie von <i>Echinococcus multilocularis</i> .....	- 4 -
2.3 Lebenszyklus.....	- 6 -
2.4 Historie von <i>Echinococcus multilocularis</i> .....	- 7 -
2.5 Alveoläre Echinokokkose .....	- 9 -
2.5.1 Alveoläre Echinokokkose beim Zwischenwirt.....	- 9 -
2.5.2 Alveoläre Echinokokkose des Menschen .....	- 9 -
2.6 Diagnose .....	- 10 -
2.6.1 Diagnose beim Tier .....	- 10 -
2.6.2 Diagnose beim Menschen.....	- 12 -
2.7 Therapie .....	- 12 -
2.7.1 Therapie beim Tier .....	- 12 -
2.7.2 Therapie beim Menschen.....	- 13 -
2.8 Epidemiologie.....	- 13 -
2.8.1 Epidemiologie in Wildtieren .....	- 13 -
2.8.2 Epidemiologie der Alveolären Echinokokkose des Menschen.....	- 15 -
2.9 Genomaufbau.....	- 16 -
2.10 Mitochondriales Genom.....	- 16 -
2.11 Genotypen von <i>Echinococcus multilocularis</i> .....	- 17 -
3. Ziel der vorliegenden Arbeit .....	- 19 -
4. Material und Methoden.....	- 21 -
4.1 Materialien.....	- 21 -
4.1.1 Untersuchungsmaterial .....	- 21 -
4.1.2 Primer.....	- 23 -
4.1.3 Verbrauchsmaterial .....	- 24 -
4.1.4 Technische Ausstattung .....	- 25 -
4.1.5 Chemikalien, gebrauchsfertige Produkte und Testsubstanzen.....	- 27 -
4.1.6 Puffer und Lösungen .....	- 28 -
4.1.7 Software .....	- 29 -

# Inhaltsverzeichnis

---

4.2	Methoden .....	- 29 -
4.2.1	Pathologische Arbeiten .....	- 29 -
4.2.2	Parasitologische Arbeiten.....	- 29 -
4.2.2.1	Intestinal Scraping Technique (IST).....	- 29 -
4.2.2.2	Sedimentation and Counting Technique (SCT).....	- 31 -
4.2.3	Molekularbiologische Arbeiten .....	- 31 -
4.2.3.1	DNA-Isolierung .....	- 31 -
4.2.3.2	Überprüfung der DNA-Quantität und -Reinheit.....	- 32 -
4.2.3.3	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	- 33 -
4.2.3.4	Agarose-Gelelektrophorese .....	- 34 -
4.2.3.5	PCR-Reinigung.....	- 35 -
4.2.3.6	Sequenzierung.....	- 36 -
4.2.3.7	Mikrosatellitenbestimmung.....	- 37 -
4.2.4	Statistische Auswertung .....	- 38 -
4.2.5	Räumliche Darstellung und Auswertung der Daten .....	- 38 -
4.2.6	Phylogenetische Untersuchungen .....	- 39 -
5.	Ergebnisse .....	- 40 -
5.1	Sequenzierung .....	- 40 -
5.1.1	Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit 1.....	- 40 -
5.1.2	NADH-Dehydrogenase Untereinheit 1 .....	- 42 -
5.1.3	ATP-Synthase Untereinheit 6.....	- 44 -
5.2	EmsB-Mikrosatellitenanalyse .....	- 46 -
5.2.1	Visuelle Auswertung .....	- 46 -
5.2.2	Gruppierung der Mikrosatelliten-Profile mittels Kohonennetz.....	- 50 -
5.2.3	Gruppierung der Mikrosatelliten-Profile mittels Sammons nicht-linearer Kartierung mit k-mean-clustering .....	- 54 -
5.3	Phylogenie.....	- 55 -
5.3.1	Phylogenetische Untersuchungen anhand der Nukleotidsequenzen .....	- 55 -
5.3.2	Phylogenetische Untersuchungen anhand von Aminosäuresequenzen ..	- 63 -
5.4	Räumliche Verteilung .....	- 67 -
5.4.1	Räumliche Verteilung von mitochondrialen Genotypen .....	- 67 -
5.4.2	Räumliche Verteilung von EmsB-Profilen.....	- 69 -
6.	Diskussion.....	- 73 -
6.1	Typisierung mit Hilfe genetischer Marker aus dem mitochondrialen Genom	- 73 -
6.1.1	Cytochrom-c-Oxidase, Untereinheit 1 .....	- 73 -

# Inhaltsverzeichnis

---

6.1.2	NADH-Dehydrogenase, Untereinheit 1 .....	- 74 -
6.1.3	ATP-Synthase Untereinheit 6.....	- 75 -
6.2	Mikrosatellitenanalyse .....	- 76 -
6.2.1	Visuelle Auswertung .....	- 78 -
6.2.2	Gruppierung der Mikrosatelliten mittels Kohonennetzen .....	- 80 -
6.2.3	Gruppierung mittels Sammons nicht-linearer Kartierung mit k-mean-Clustering .....	- 83 -
6.3	Phylogenie.....	- 84 -
6.3.1	Phylogenetische Zuordnung anhand von Nukleotidsequenzen .....	- 84 -
6.3.2	Phylogenetische Zuordnung anhand von Aminosäuresequenzen .....	- 91 -
6.4	Räumliche Verteilung von Genotypen .....	- 92 -
	Literaturverzeichnis .....	- 98 -
	Danksagung .....	- 106 -
	Wissenschaftliche Beiträge .....	- 108 -
	Ehrenwörtliche Erklärung .....	- 111 -

### Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AE	Alveoläre Echinokokkose
ABZ	Albendazol
AS	Aminosäure
atp6	ATP-Syntase Untereinheit 6
BMZ	Benzimidazol
bp	Basenpaare
C	Cytosin
cox1	Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit 1
ddNTP	dideoxynucleotide-tri-phosphate, Didesoxyribonukleosidtriphosphate
DNA	desoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure
E	<i>Echinococcus</i>
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung
IST	intestinal scraping technique
MALDI-TOF MS	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry
MBZ	Mebendazol
mtDNA	mitochondriale DNA
nd1	NADH-Dehydrogenase Untereinheit 1
SCT	sedimentation and counting technique
PCR	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion

## Abkürzungsverzeichnis

---

PZQ	Praziquantel
RNA	ribonucleic acid; Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
snRNA	small nuclear ribonucleic acid, kleine nukleäre Ribonukleinsäure
tRNA	Transfer-RNA
RKI	Robert Koch-Institut
RT	Raumtemperatur
rpm	revolutions per minute; Umdrehungen pro Minute
T	Thymin
U	Untereinheit
WHO	World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Darstellung der zusammengefassten Prävalenzen von Studien ab 2000 von <i>E. multilocularis</i> in Rot- und Polarfüchsen in Europäischen Mitgliedsstaaten und benachbarten Ländern. ....	- 14 -
Abbildung 2:	Gemeldete Alveoläre Echinokokkose-Fälle pro Jahr in Deutschland basierend auf den Daten des RKI (survstat, <a href="https://survstat.rki.de/">https://survstat.rki.de/</a> )...	- 15 -
Abbildung 3:	Ausschnitt aus dem Alignment der cox1-Nukleotidsequenzen der untersuchten Isolate aus Brandenburg und Nordrhein-Westfalen und der Referenzsequenz AB018440. ....	- 41 -
Abbildung 4:	Ausschnitt aus dem Alignment der cox1-AS-Sequenzen der untersuchten Isolate aus Brandenburg und Nordrhein-Westfalen und der Referenzsequenz AB018440 .....	- 42 -
Abbildung 5:	Ausschnitt aus dem Alignment der nd1-Nukleotidsequenzen der untersuchten Isolate aus Brandenburg und Nordrhein-Westfalen und der Referenzsequenz AB018440. ....	- 43 -
Abbildung 6:	Ausschnitt aus dem Alignment der nd1-AS-Sequenzen der untersuchten Isolate aus Brandenburg und Nordrhein-Westfalen und der Referenzsequenz AB018440. ....	- 43 -
Abbildung 7:	Ausschnitt aus dem atp6-Nukleotidalignment der Isolate aus Brandenburg und Nordrhein-Westfalen und der Referenzsequenz AB018440. ....	- 45 -
Abbildung 8:	Ausschnitt aus dem Alignment der atp6-AS-Sequenzen der untersuchten Isolate aus Brandenburg und Nordrhein-Westfalen und der Referenzsequenz AB018440. ....	- 45 -
Abbildung 9:	Elektropherogramm des EmsB-Mikrosatellitenprofils D .....	- 47 -
Abbildung 10:	Elektropherogramm des EmsB-Mikrosatellitenprofils G .....	- 47 -
Abbildung 11:	Elektropherogramm des EmsB-Mikrosatellitenprofils H .....	- 48 -
Abbildung 12:	Elektropherogramm des EmsB-Mikrosatellitenprofils E.....	- 48 -
Abbildung 13:	Kohonennetzwerk-Analyse mit der Annahme von vier Gruppen unter Verwendung der EmsB-Profil-Daten der in dieser Arbeit untersuchten Proben und der Referenzproben aus der Schweiz.....	- 51 -
Abbildung 14:	Kohonennetzwerk-Analyse mit der Annahme von vier Gruppen unter Verwendung der EmsB-Profil-Daten der in dieser Arbeit untersuchten Proben ohne die Referenzproben aus der Schweiz. ....	- 52 -
Abbildung 15:	Kohonennetzwerk-Analyse mit der Annahme von 2x2 Gruppen unter Verwendung der EmsB-Profil-Daten der in dieser Arbeit untersuchten Proben. ....	- 53 -
Abbildung 16:	Kohonennetzwerk-Analyse mit der Annahme von 3 Gruppen unter Verwendung der EmsB-Profil-Daten der in dieser Arbeit untersuchten Proben. ....	- 53 -
Abbildung 17:	Gruppierung der visuell ermittelten EmsB-Profile mittels Sammons nicht-linearer Kartierung mit k-mean-clustering.....	- 55 -



## Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 18:	Dendrogramm konstruiert mit dem atp6-Gen-Daten der Konsenssequenz aller in dieser Arbeit ermittelten Isolate, den Sequenzen mit den jeweiligen SNPs sowie den Sequenzen entnommen aus einer Publikation von Nakao und Kollegen (Nakao <i>et al.</i> , 2007).....	- 56 -
Abbildung 19:	Dendrogramm abgeleitet von den cox1-Gen-Daten der Konsenssequenz aller in dieser Arbeit ermittelten Isolate, den Sequenzen mit den jeweiligen SNPs sowie den Sequenzen entnommen aus einer Publikation von Nakao und Kollegen (Nakao <i>et al.</i> , 2007).....	- 57 -
Abbildung 20:	Dendrogramm konstruiert mit dem nd1-Gen-Daten der Konsenssequenz aller in dieser Arbeit ermittelten Isolate, den Sequenzen mit den jeweiligen SNPs sowie den Sequenzen entnommen aus einer Publikation von Nakao und Kollegen (Nakao <i>et al.</i> , 2007).....	- 58 -
Abbildung 21:	Dendrogramm konstruiert mit dem atp6-Gen-Daten der Konsenssequenz aller in dieser Arbeit ermittelten Isolate, den Sequenzen mit den jeweiligen SNPs sowie den verfügbaren Sequenzinformationen aus der NCBI-Datenbank.....	- 59 -
Abbildung 22:	Dendrogramm abgeleitet aus den cox1-Gen-Daten der Konsenssequenz aller in dieser Arbeit ermittelten Isolate, den Sequenzen mit den jeweiligen SNPs sowie den verfügbaren Sequenzinformationen aus der NCBI-Datenbank.....	- 61 -
Abbildung 23:	Dendrogramm konstruiert aus den nd1-Gen-Daten der Konsenssequenz aller in dieser Arbeit ermittelten Isolate, den Sequenzen mit den jeweiligen SNPs sowie den verfügbaren Sequenzinformationen aus der NCBI-Datenbank.....	- 62 -
Abbildung 24:	AS-Dendrogramm abgeleitet aus den atp6-AS-Daten der Konsenssequenz aller in dieser Arbeit ermittelten Isolate, den AS-Sequenzen mit den jeweiligen SNPs sowie den verfügbaren AS-Sequenzinformationen aus der NCBI-Datenbank. ....	- 63 -
Abbildung 25:	AS-Dendrogramm konstruiert aus den cox1-AS-Daten der vorliegenden Arbeit sowie den verfügbaren cox1-AS-Sequenzen aus der NCBI-Datenbank. ....	- 65 -
Abbildung 26:	AS-Dendrogramm abgeleitet aus den nd1-AS-Daten der Konsenssequenz aller in dieser Arbeit ermittelten Isolate, den AS-Sequenzen mit den jeweiligen SNPs sowie den verfügbaren AS-Sequenzinformationen aus der NCBI-Datenbank. ....	- 66 -
Abbildung 27:	Geografische Darstellung der Sequenzunterschiede A) in Brandenburg und B) in Nordrhein-Westfalen.....	- 68 -
Abbildung 28:	Geografische Darstellung der optisch ermittelten EmsB-Profile in Brandenburg .....	- 70 -
Abbildung 29:	Geografische Darstellung der optisch ermittelten EmsB-Profile in Nordrhein-Westfalen.....	- 71 -
Abbildung 30:	Streckungsorte der Füchse mit zugehörigen EmsB-Profilen der Wurmisolate und Darstellung der Gruppierung mittels SaTScan-Analyse. ....	- 72 -

## 1. Zusammenfassung

Die alveoläre Echinokokkose (AE) wird durch den kleinen Fuchsbandwurm *Echinococcus multilocularis* (*E. multilocularis*) verursacht und stellt eine gefährliche Zoonose dar. Der Rotfuchs (*Vulpes vulpes*) ist in Europa der Hauptwirt des Parasiten. Für den vorwiegend sylvatischen Lebenszyklus ist ein obligater Wirtswechsel nötig. Als Zwischenwirte dienen *E. multilocularis* Nagetiere, insbesondere Wühlmäuse (*Arvicolidae*). Der Mensch, als Fehlwirt, infiziert sich wie die Zwischenwirte über die orale Aufnahme der infektiösen Eier des Parasiten. Die aktuelle Verbreitung von *E. multilocularis* wurde für die Region Mittel- und Nord-Eurasien sowie im nördlichen Teil Nordamerikas beschrieben (Deplazes *et al.*, 2017).

Seit vielen Jahrzehnten besteht eine anhaltende Diskussion über die phylogenetische Einordnung und die genetische Diversität von *E. multilocularis* im Vergleich zu anderen Echinokokkenarten. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte die Genotypisierung von *E. multilocularis*-Isolaten, die vorwiegend aus dem Raum Brandenburg stammen, einen Überblick über die Diversität des Parasiten und dessen Verteilung in einem Endemiegebiet geben.

Hierfür wurden insgesamt 101 Füchse, 91 aus Brandenburg und zehn aus Nordrhein-Westfalen untersucht. Um Mischinfektionen des Hauptwirtes mit verschiedenen Genotypen des Parasiten nachweisen zu können, wurden jeweils 5 Wurmisolate pro Fuchs untersucht. Zur Genotypisierung wurden drei mitochondriale Marker – Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit 1 (cox1), NADH Dehydrogenase Untereinheit 1 (nd1) und ATP-Synthase Untereinheit 6 (atp6) – sowie ein nuklearer Mikrosatelliten-Marker namens EmsB verwendet. Zur Identifizierung von Nukleotidpolymorphismen wurden die mitochondrialen Marker sequenziert. Die Sequenzdaten der Proben aus der vorliegenden Arbeit wurden sowohl untereinander als auch mit publizierten Sequenzdaten verglichen. Die Phylogenie wurde ebenfalls mittels der mitochondrialen Marker rekonstruiert. Anhand der Auswertung der Elektropherogramme des EmsB-Markers wurden die EmsB-Profile bestimmt und mit Hilfe der Methode des Kohonennetzes und der Methode zur Gruppierung der Sammons nicht-linearer Kartierung mit k-mean-clustering bestätigt.

Sowohl durch die mitochondrialen Marker als auch durch die EmsB-Mikrosatellitenanalyse konnten bei Füchsen in Brandenburg und in Nordrhein-Westfalen Mischinfektionen mit unterschiedlichen *E. multilocularis*-Genotypen nachgewiesen

## Zusammenfassung

---

werden. Weiterhin zeigten die Untersuchungen eine heterogene Verteilung der Genotypen in Brandenburg. Die Analysen mittels der mitochondrialen Marker ergaben weiterhin, dass die in dieser Arbeit untersuchten Proben zu dem europäischen Haplotyp zählen. Für den Mikrosatelliten EmsB werden fünf Profile (D, E, F, G und H) als die am häufigsten in Europa vorkommenden Profile beschrieben (Knapp *et al.*, 2008). Vier der fünf Profile (D, E, G und H) wurden in den untersuchten Proben aus Brandenburg und Nordrhein-Westfalen nachgewiesen. Das EmsB-Profil G wurde dabei am häufigsten gefunden. Somit konnte gezeigt werden, dass die vier verwendeten Marker auch für die Genotypisierung von Proben aus einem begrenzten endemischen Gebiet nutzbar sind. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten bilden eine Grundlage für weitere epidemiologische Studien im Raum Brandenburg und den angrenzenden Bundesländern.

## Summary

The alveolar echinococcosis (AE) is a serious zoonosis caused by the small fox tapeworm *E. multilocularis*. In Europe the definitive host of this parasite is the red fox (*Vulpes vulpes*). A change in the host is obligate for the predominantly sylvatic lifecycle. Rodents, especially voles (*Arvicolidae*), serve as intermediate host for *E. multilocularis*. Humans, as accidental dead-end intermediate hosts, get like other intermediate hosts infected by oral uptake of infectious eggs of the parasite. The current distribution of *E. multilocularis* comprises middle and north Eurasia and the northern part of North America (Deplazes *et al.*, 2017). Since many decades, a discussion has been ongoing about the phylogeny and the genetic diversity of *E. multilocularis* in comparison to other *Echinococcus* species. In the frame of this doctoral thesis, an overview about the diversity and the distribution of this parasite in an endemic area is provided by genotyping of *E. multilocularis* isolates, predominantly from the area of Brandenburg.

Altogether 101 foxes, 91 derived from Brandenburg and ten derived from North Rhine-Westphalia were investigated. To detect mixed infections of the definitive host with different genotypes of the parasite, five worm isolates per fox were analyzed. For genotyping three mitochondrial markers – cytochrome c oxidase subunit 1 (cox1), NADH dehydrogenase subunit1 (nd1) and ATP synthase subunit 6 (atp6) – as well as a nuclear microsatellite marker named EmsB was used. To identify nucleotide polymorphisms, the mitochondrial markers were sequenced. The sequence data were compared to each

## Zusammenfassung

---

other and to published data. On the basis of the evaluation of the EmsB electropherograms, the EmsB-profiles were determined and confirmed by the methods of kohonen network and grouping of Sammons non-linear mapping with k-mean clustering.

With both, the mitochondrial makers and the EmsB microsatellite analysis, mixed infection with different *E. multilocularis* genotypes of foxes from Brandenburg and North Rhine-Westphalia could be detected. Furthermore, a heterogenic distribution of these genotypes in Brandenburg became evident. The analysis with the mitochondrial marker revealed that the samples investigated in this study belong to the European haplotype of *E. multilocularis*. For the microsatellite EmsB, five profiles (D, E, F, G and H) are described as dominating in Europe (Knapp *et al.*, 2008). Four out of these five profiles (D, E, G and H) were detected in the samples from Brandenburg and North Rhine-Westphalia. The EmsB profile G was the most common one. It could be shown that the four markers were suitable for genotyping samples obtained from a restricted endemic area. The data of this study form a basis for further epidemiological studies in the region of Brandenburg and the adjacent federal states.

## 2. Einleitung

### 2.1 Aktuelle Systematik der Echinokokken

Bisher sind neun Arten der Gattung *Echinococcus* (*E.*) anerkannt, diese sind *Echinococcus granulosus* sensu stricto (BATSCH, 1786) (Rommel *et al.*, 2000; Thompson *et al.*, 1995), *Echinococcus multilocularis* (LEUCKART, 1863) auch als kleiner Fuchsbandwurm bezeichnet, sowie *Echinococcus vogeli* (RAUSCH und BERNSTEIN, 1972), *Echinococcus oligarthrus* (DIESING, 1863) mit dem korrekten Namen *E. oligarthra* (Lymbery, 2017; Nakao *et al.*, 2013), *Echinococcus felidis*, *Echinococcus equinus*, *Echinococcus orteppi*, *Echinococcus canadensis* und *Echinococcus shiquicus* (Nakao *et al.*, 2013). *E. oligarthrus* (*E. oligarthra*) ist die Schwesterspezies zu allen anderen acht Echinokokkenarten. Des Weiteren sind *E. multilocularis* und *E. shiquicus* jeweils Schwesterarten sowie *E. granulosus* s. s. und *E. felidis* sowie *E. orteppi* und *E. canadensis*. Außerdem bilden *E. equinus* mit *E. shiquicus*, *E. multilocularis*, *E. orteppi* und *E. canadensis* eine Klade (Nakao *et al.*, 2013). Es ist jedoch zu beachten, dass die Taxonomie und die Systematik innerhalb des Genus *Echinococcus* weiterhin diskutiert werden.

Die Gattungen *Echinococcus* und *Taenia* bilden die Familie der *Taeniidae*. Diese ist eine von insgesamt 15 Familien der Ordnung *Cyclophyllida* (Khalil *et al.*, 1994). Die fünf Ordnungen, *Caryophyllida*, *Spatheobothriida*, *Pseudophyllida*, *Proteocephalida* und *Cyclophyllida*, bilden die Klasse der *Cestoda* (Bandwürmer). Die Gruppe der *Neodermata* umfasst die obligat parasitisch lebenden Klassen der *Monogenea* (Hakensaugwürmer), *Trematoda* (Saugwürmer) und der *Cestoda* (Hahn *et al.*, 2014). Die frei lebenden *Turbellaria* (Strudelwürmer) zusammen mit den drei Klassen der *Neodermata* bilden den Stamm der *Plathelmintha* (Plattwürmer), welcher zum Reich der *Animalia* (Tiere) zählt.

### 2.2 Morphologie von *Echinococcus multilocularis*

Der adulte Fuchsbandwurm hat eine Länge von 1,2 bis 4,5 mm und besteht in der Regel aus 5 Proglottiden, jedoch kann die Anzahl zwischen zwei bis sechs Segmenten variieren (Deplazes *et al.*, 2001). Terminal befindet sich das gravide Endglied. Der Scolex von *E. multilocularis* besitzt den typischen Aufbau der *Taeniidae*. Er besteht aus

## Einleitung

---

einem apikalen, doppelten Hakenkranz, auch als Rostellum bezeichnet, und vier Saugnäpfen (Eckert *et al.*, 2001).

Angepasst an die obligat parasitäre Lebensweise besitzt *E. multilocularis*, wie alle Echinokokken, keinen Verdauungstrakt. Die Aufnahme der Nährstoffe erfolgt über das Tegument, ein Synzytium der äußeren Hülle, welches resistent gegenüber dem Magensaft und der Gallenflüssigkeit des Wirtes ist.

Der adulte Wurm ist Hermaphrodit. Die Fortpflanzungskanäle enden in einem Genitalporus, welcher sich vor der Gliedmitte befindet. In diesem Segment sind 200 bis 250 Eier enthalten. Aufgrund der Lage des Genitalporus sowie anhand des sackartigen Uterus ist der adulte *E. multilocularis* vom adulten *E. granulosus* Wurm morphologisch zu unterscheiden. Der Genitalporus liegt bei *E. granulosus* im Gegensatz zum kleinen Fuchsbandwurm meist nahe der Mitte des Gliedes oder dahinter. Der Uterus des Hundebandwurms weist Ausstülpungen auf, die eine verzweigte Struktur in den mikroskopischen Bildern darstellen. Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal ist die Größe der adulten Würmer. So ist *E. granulosus* s. s. mit 2 bis 7 mm Länge größer als *E. multilocularis*. Des Weiteren ist das gravide Endglied bei *E. multilocularis* meist weniger als die halbe Körperlänge lang, bei *E. granulosus* hingegen macht das gravide Endglied meist mehr als die halbe Länge des adulten Wurms aus.

Die Eier von *E. multilocularis* lassen sich morphologisch nicht von anderen Taeniiden-Eiern unterscheiden. Sie sind rundlich, von einer radiär gestreiften dickwandigen Hülle umgeben und weisen einen Durchmesser von 30 bis 40 µm auf. Die Eigenschaften der Hülle schützen die Eier vor Umwelteinflüssen. Unter idealen Bedingungen, das heißt hohe Luftfeuchte und niedrige Temperatur, können die Eier über Monate bis hin zu Jahren vital bleiben (Federer *et al.*, 2015; Veit *et al.*, 1995). Sie beinhalten die Oncosphäre. Diese stellt das erste Larvalstadium dar.

Das zweite Larvalstadium ist der Metacestode, welcher sich im Zwischenwirt, inkl. Fehlwirten wie dem Menschen, entwickelt. Der Metacestode besteht aus einer Vielzahl von Zellsträngen und Vesikeln, er ist somit multivesikulär. Von der quasi alveolenartigen Struktur des Metacestoden ist der Name der von *E. multilocularis* in den Zwischenwirten ausgelösten Erkrankung „alveoläre Echinokokkose“ (AE) abgeleitet.

### 2.3 Lebenszyklus

Der primär sylvatische Lebenszyklus von *E. multilocularis* ist an die Jäger/Beutebeziehung zwischen Karnivoren und Nagern angepasst und somit durch einen obligaten Wirtswechsel von Zwischen- zu Endwirt gekennzeichnet.

Karnivoren dienen *E. multilocularis* als Endwirt. In Europa ist der Rotfuchs (*Vulpes vulpes*) der Hauptendwirt. Marderhund (*Nyctereutes procyonoides*), Polarfuchs (*Alopex lagopus*), Wolf (*Canis lupus*), Kojote (*Canis latrans*), Haushund (*Canis lupus familiaris*) und Hauskatze (*Felis silvestris catus*) können ebenfalls Endwirte für den Parasiten darstellen. Der adulte Wurm entwickelt sich im Dünndarm des Endwirtes, in dem er sich mit Hilfe des Hakenkranzes und der Saugnäpfe an der Dünndarmwand verankert. 26 bis 28 Tage nach der Aufnahme des 2. Larvalstadiums (Metacestode) werden die graviden Eier über die Losung des Endwirtes in die Umwelt freigesetzt. Dabei werden meist die kompletten graviden Endglieder vom Rest des Wurmes abgetrennt und mit dem Kot ausgeschieden. Dadurch kommt es zur Kontamination des Bodens und der bodennah wachsenden Vegetation mit Eiern von *E. multilocularis*. Auch das Fell der Endwirte kann mit Eiern von *E. multilocularis* kontaminiert sein.

Es ist zu beachten, dass es Unterschiede in der Vitalität und der Anzahl der sich entwickelnden Parasiten zwischen den unterschiedlichen Endwirten gibt. Füchse und Hunde sind ähnlich empfänglich für den Parasiten und weisen in Untersuchungen eine vergleichbare Anzahl an vitalen *E. multilocularis* Würmern in ihrem Darmtrakt auf (Dyachenko *et al.*, 2008; Kapel *et al.*, 2006; Thompson *et al.*, 2006; Thompson *et al.*, 1983). Dagegen zeigte sich in Experimenten, dass Katzen eine verminderte Anzahl an adulten Würmern ausscheiden und dass diese häufig auch nicht vollständig entwickelt sind (Dyachenko *et al.*, 2008; Kapel *et al.*, 2006; Thompson *et al.*, 2006; Thompson *et al.*, 1983).

Als natürliche Hauptzwischenwirte dienen verschiedene Nagetierarten, insbesondere Wühlmäuse (*Arvicolidae*). Diese infizieren sich über die orale Aufnahme der vitalen Eier. Im Dünndarm kommt es zum Schlüpfen des ersten Larvalstadiums. Anschließend penetriert die Larve die Dünndarmwand und wandert über den Blutstrom primär in die Leber, in der sie sich festsetzt und sich zum zweiten Larvalstadium, dem Metacestoden, entwickelt.

Der Lebenszyklus schließt sich, indem ein infizierter Zwischenwirt von einem Endwirt gefressen wird und sich die Larve letztlich zum adulten Wurm entwickelt.

Fehlwirte für *E. multilocularis* können der Mensch, Schweine, Pferde, Affen, aber auch Hunde sein (Böttcher *et al.*, 2013; Deplazes *et al.*, 2001; Eckert *et al.*, 2001; Karamon *et al.*, 2012; Vuitton *et al.*, 2011). Auch die Fehlwirte infizieren sich über die orale Aufnahme von vitalen Eiern von *E. multilocularis*. Als Fehlwirte werden diejenigen Wirte des Parasiten bezeichnet, welche sich mit ihm infizieren können, aber kein Schließen des Lebenszyklus ermöglichen. Dies kann sowohl daran liegen, dass sich der Parasit in ihnen nicht vollständig entwickelt, als auch dadurch verursacht sein, dass der Fehlwirt keine natürliche Beute für den Endwirt darstellt und somit der Kreislauf nicht geschlossen werden kann. So ist der Mensch offenkundig Fehlwirt für *E. multilocularis*, weil er keine Beute für die möglichen Endwirte darstellt.

### 2.4 Historie von *Echinococcus multilocularis*

Die erste Beschreibung einer Lebererkrankung, welche vermutlich durch Echinokokken verursacht wurde, ist auf einen Bericht von Hippokrates 400 vor Christus zurückzuführen (Tappe *et al.*, 2010). Bis in das 18. Jahrhundert hinein wurde der Erreger unter dem Namen *Taenia echinococcus* als Ursache derartiger Lebererkrankungen geführt. Erstmals 1786 beschrieb Batsch *E. granulosus* und prägte dessen Namen. Bis in das 19. Jahrhundert hinein war nur der Hundebandwurm als Erreger derartiger Leberläsionen bekannt und unter verschiedenen Namen publiziert. Dies erschwert bis heute einen Vergleich der geschilderten Fälle. 1852 und 1854 berichteten Buhl und 1854 Zeller eine neuartige Leberveränderung, welche wir heute als AE einstufen würden (Tappe *et al.*, 2007). 1855 wurde von Virchow das erste Mal ausführlich die humane AE beschrieben (Virchow, 1856). Er schlussfolgerte, dass es sich um eine veränderte Form von *Echinococcus* handelt, schloss aber nicht auf eine eigenständige Spezies. Es folgten weitere Berichte über derartige Leberveränderungen von anderen Medizinern und Forschern aus dieser Zeit. 1863 beschrieb Leuckart das erste Mal die Morphologie eines adulten *Echinococcus multilocularis* und prägte den Namen des Parasiten. Er schilderte, dass die Morphologie unterschiedlich sei, zu allen anderen bis dahin bekannten Echinokokken-Formen. Jedoch beschrieb er, wie zuvor Virchow, diesen Parasiten als eine Form und nicht als eigenständige Spezies (Tappe *et al.*, 2010). Daraufhin entbrannte eine mehrere Jahrzehnte andauernde Diskussion darüber, ob es nur eine Spezies, den kleinen Hundebandwurm mit verschiedenen Ausprägungsformen gibt, oder ob mehrere Arten existieren (Tappe *et al.*, 2010). Die Vertreter der Auffassung, dass nur



## Einleitung

---

eine Spezies existierte, wurden als „Unizisten“ bezeichnet. Ihnen gegenüber standen die „Dualisten“. Sie vertraten die Meinung, dass es mehrere Spezies von Echinokokken gab (Tappe *et al.*, 2007; Tappe *et al.*, 2010).

Dieser Disput konnte erst in den 1950er Jahren geklärt werden, als Rausch und Schiller in Alaska (Rausch *et al.*, 1954) und Vogel (Vogel, 1955) in der Schwäbischen Alb die Existenz von *E. multilocularis* als eigene Spezies bewiesen. Bei Felduntersuchungen in Alaska entdeckten Rausch und Schiller Leberläsionen in Wühlmäusen und verfütterten diese an Polarfüchse. Nach drei Monaten wurden die Füchse seziert. In ihrem Darm wurden adulte *E. multilocularis*-Würmer und gravide Endglieder gefunden (Tappe *et al.*, 2010). Gravide Proglottide wurden an verschiedene Nagerspezies verfüttert und diese anschließend auf eine Infektion hin untersucht (Rausch, 1954). Dadurch konnte der Lebenszyklus des Parasiten aufgeklärt werden. Die Autoren beschrieben die neue Spezies als *E. sibiricensis*, vermuteten aber, dass diese auch identisch zu europäischen Spezies *E. multilocularis* sein könnte (Rausch, 1953; Rausch *et al.*, 1954). Parallel dazu entdeckte Vogel in der Schwäbischen Alb, einem historischen Endemiegebiet, Metacestoden in Feldmäusen und adulte Würmer von *E. multilocularis* in Rotfüchsen (Vogel, 1955). Zudem führte er ebenfalls Infektionsversuche mit Eiern aus Kot von Karnivoren und Nagern durch. Mit diesen Ergebnissen konnte sowohl morphologisch als auch biologisch nachgewiesen werden, dass es sich bei dem gefundenen Parasiten um eine eigene Spezies handelt.

In der jüngeren Geschichte des kleinen Fuchsbandwurmes kam es zur Entdeckung von *E. shiquicus* (Xiao *et al.*, 2005) und zu der Fragestellung, ob dieser Parasit eine Form von *E. multilocularis* oder eine eigenständige Spezies ist. Anhand genetischer und morphologischer Merkmale konnte festgestellt werden, dass es sich um eine eigene Spezies handelt. *E. shiquicus* ist, wie in 2.1 beschrieben, eine Schwesterspezies von *E. multilocularis*. Als Endwirt dient *E. shiquicus* *Vulpes ferrilata*, der Tibetfuchs, und als Zwischenwirt der schwarzlippige Pfeifhase (*Ochotona curzoniae*). Erstmals wurde *E. shiquicus* als Isolat aus einem Yak aus der Qinghai-Tibet Hochebene beschrieben. Diese Region gilt als Endemiegebiet von *E. shiquicus* (Romig *et al.*, 2017; Xiao *et al.*, 2003; Xiao *et al.*, 2005).

Bis heute sind die genetische Variabilität von *E. multilocularis* und der Status möglicher Genotypen dieses Parasiten ungeklärt. Unbekannt ist auch, ob die Genotypen lokale genetische Variationen des Parasiten repräsentieren oder Hinweise auf eine geografische Unterteilung zulassen.

### **2.5 Alveoläre Echinokokkose**

#### **2.5.1 Alveoläre Echinokokkose beim Zwischenwirt**

Wie in Abschnitt 2.3 beschrieben, kommt es zur Infektion des Zwischenwirtes über die orale Aufnahme der Wurmeier. Nach Wanderung der Oncosphäre, primär in die Leber, setzt sich die Larve im Lebergewebe fest und es findet anschließend die Entwicklung zum Metacestoden, dem zweiten Larvalstadium, statt. Diese Larve wächst „infiltrativ“ in das umliegende Lebergewebe ein und kann dadurch eine Leberschädigung verursachen. Der Parasit hat sich in seiner Entwicklung an die relativ kurze Lebensdauer der natürlichen Zwischenwirte, verschiedene Nagetierspezies, angepasst, indem der Metacestode relativ schnell proliferiert. Dabei werden Protoskolizes (Kopfanlagen) etwa innerhalb von zwei bis drei Monaten nach der Infektion ausgebildet. Während dieser Zeit kommt es auch zur Zunahme der Größe der Larve. Dieser Prozess endet gewöhnlich nach der Ausbildung der Kopfanlagen. Die Proliferation der Larve ist dem infiltrativen Wachstum eines malignen Tumors ähnlich. Durch Streuung von Larvalgewebe kann es auch zum Befall anderer innerer Organe kommen (Deplazes *et al.*, 2001). Im fortgeschrittenen Verlauf der Erkrankung sind Gewichtsverlust des Wirtes und Leberfunktionsstörungen zu beobachten (Eckert *et al.*, 2001). Sie können mit einer Vergrößerung der Leber und des Abdomens einhergehen.

#### **2.5.2 Alveoläre Echinokokkose des Menschen**

Infiziert sich der Mensch mit lebensfähigen *E. multilocularis*-Eiern, wie im Abschnitt 2.3 beschrieben, kann es zur Ausbildung der AE kommen. Diese stellt eine schwere Zoonose dar. Dazu muss, wie in Abschnitt 2.5.1 beim Zwischenwirt beschrieben, aus der Oncosphäre eine Larve schlüpfen. Es folgt die Migration der Larve aus dem Darm vorzugsweise in die Leber, in der sie sich festsetzt und sich der Metacestode entwickelt. Im Gegensatz zur AE in den natürlichen Zwischenwirten bildet der Metacestode in einem Fehlwirt keine oder nur unvollständige Hakenkränze aus (Tappe *et al.*, 2007). Der Metacestode im Menschen ist multivesikulär aufgebaut und kann sich durch Knospung asexuell vermehren. Dies geschieht häufig in der Peripherie des Metacestoden. Das Wachstum und die Ausbreitung der Parasitenlarve erfolgt infiltrativ in das umliegende Gewebe und wird oft als „tumorartig“ bezeichnet (Kern, 2010; Kern *et al.*, 2017). Im Zentrum der Vesikel befindet sich oftmals nekrotisches Gewebe. Weiterhin ist es möglich, dass Keimzellen in die Blutbahn oder die Lymphgefäße

gelangen. Dadurch kommt es zu einer Ausbreitung des Parasiten in andere Organe, wie zum Beispiel das Gehirn oder die Lunge (Tappe *et al.*, 2008). Diese Form der Ausbreitung wird in der Literatur auch als „Metastasierung“ bezeichnet (Eckert *et al.*, 2001). Symptome der humanen AE treten oft erst in der späten Phase der Infektion auf und sind meist unspezifisch. Sie umfassen Ikterus (Gelbsucht), Hepatomegalie (Lebervergrößerung), Magenschmerzen und Gewichtsverlust (Deplazes *et al.*, 2001; Eckert *et al.*, 2001).

## 2.6 Diagnose

### 2.6.1 Diagnose beim Tier

Bei der Diagnose ist zu unterscheiden, ob ein Endwirt oder Zwischen- bzw. Fehlwirt untersucht wird. Dementsprechend werden adulte bzw. larvale Stadien des Parasiten nachgewiesen. Im Hinblick auf eine Differentialdiagnostik bei Lebertumoren sollte die Möglichkeit, dass Hunde als Endwirt, aber auch als Fehlwirt von einem *E. multilocularis*-Befall betroffen sein können, nicht vernachlässigt werden. Des Weiteren ist bei einer Differentialdiagnostik bei Endwirten, insbesondere bei Kotuntersuchungen auf Wurmeier, eine mögliche Infektion mit *Taenia*-Spezies zu beachten.

In Endwirten kann *E. multilocularis* mit Hilfe von klassischen parasitologischen Methoden nachgewiesen werden. Die Sedimentations-Zähl-Technik (sedimentation and counting technique, SCT) stellte lange Zeit den Goldstandard dar (Conraths *et al.*, 2015; Eckert *et al.*, 2001). Eine weitere Standardmethode ist die Darm-Schabemethode (intestinal scraping technique, IST) (Conraths *et al.*, 2015; Eckert *et al.*, 2001). Bei beiden Methoden wird über den Nachweis der adulten *E. multilocularis*-Würmer anhand deren Morphologie die Diagnose gestellt. Die Nachteile dieser Methoden sind zum einen, dass vor den eigentlichen Untersuchungen eine Autopsie der Tiere nötig ist und zum anderen, dass diese Methoden sehr zeit- und arbeitsintensiv sind und somit nur eine geringe Anzahl von Proben pro Tag untersucht werden kann (Conraths *et al.*, 2015; Eckert *et al.*, 2001).

Eine weitere klassische parasitologische Methode ist die Untersuchung von Kotproben der Endwirte auf Bandwurmeier. Dabei sind verschiedene Verfahren möglich. Eine häufig verwendete Methode ist die Sedimentations-Flotationsmethode (Conraths *et al.*, 2015; Eckert *et al.*, 2001; Mathis *et al.*, 1996). Dabei wird dem Kot Wasser zugegeben

## Einleitung

---

und die homogenisierte Probe durch ein Sieb von groben Bestandteilen gereinigt. Es folgten ein Sedimentationsschritt und anschließend ein Flotationsschritt mittels gesättigter Zuckerlösung oder einer Zinkchloridlösung. Daraufhin können die Bandwurmeier von der Flüssigkeitsoberfläche mittels Deckgläschen abgenommen und mikroskopisch untersucht werden (Eckert *et al.*, 2008; Liccioli *et al.*, 2012). Da sich *E. multilocularis*-Eier morphologisch nicht von anderen Taeniden-Eiern unterscheiden, ist eine anschließende molekularbiologische Untersuchung der separierten Eier nötig.

Molekulare Methoden zum Nachweis des Parasitengenoms werden immer häufiger eingesetzt. Dabei können sowohl adulte als auch larvale Stadien mittels PCR nachgewiesen werden. Zudem ist es grundsätzlich möglich, die DNA des Parasiten direkt im Kot von Endwirten zu detektieren. Durch inhibierende Stoffe im Kot, aber auch die dickschalige und feste Hülle der Eier, die das Extrahieren der DNA erschwert, ist die Sensitivität und Spezifität dieser Copro-PCRs oft gering. Um dieses Problem in den Griff zu bekommen, werden neuerdings magnetische Fangmethoden (Magnetic Capture Method) verwendet. Dabei wird im ersten Schritt mit Hilfe einer biotinylierten *E. multilocularis*-spezifischen Sonde die Parasiten-DNA gebunden. In einem Hybridisierungsschritt wird anschließend der DNA/Sonden-Komplex an Streptavidin behüllte magnetische Kügelchen (magnetic beads) gebunden. Anschließend wird durch einen oder mehrere Waschschrte und unter Einsatz eines Magneten zur Bildung eines Pellets des DNA/Sonden/magnetische Kügelchen-Komplex die angereicherte Parasiten-DNA gereinigt und die inhibierenden Stoffe entfernt (Isaksson *et al.*, 2014; Oines *et al.*, 2014; Wahlström *et al.*, 2016). Mit Hilfe eines Denaturierungsschrittes wird die *E. multilocularis*-DNA von dem Sonden/magnetische Kügelchen-Komplex getrennt. Durch die Verwendung eines Magneten bildet sich anschließend ein Pellet des Sonden/magnetische Kügelchen-Komplexes und der Überstand mit der Ziel-DNA kann für weitere molekulare Untersuchungen verwendet werden.

In Zwischenwirten (inkl. Fehlwirten) erfolgt zur Diagnostik eine Sektion und die Untersuchung auf Leberläsionen. Weiterhin werden, wie oben beschrieben, die PCR, aber auch Antikörpernachweise (Westernblot oder ELISA) zur Bestätigung von pathologischen Befunden verwendet (Siles-Lucas *et al.*, 2017).

### 2.6.2 Diagnose beim Menschen

Die Diagnostik beim Menschen besteht aus einer Kombination von Antikörpernachweis mittels ELISA oder Westernblot und bildgebenden Verfahren. Dabei sind u. a. Lebertumore und andere Raumfordernde Prozesse in der Leber differentialdiagnostisch zu beachten (Kern *et al.*, 2017; Siles-Lucas *et al.*, 2017). Desweiteren ist es möglich, dass der Patient nicht serokonvertiert, obwohl eine Infektion vorliegt (Craig, 2003; Eckert *et al.*, 2001), und somit keine Antikörper nachgewiesen werden können. Nach einer Biopsie oder Resektion des befallenen Organs beziehungsweise Teilen des Organs, kann das Probenmaterial mit molekularbiologischen Methoden untersucht werden (Eckert *et al.*, 2001; Siles-Lucas *et al.*, 2017).

## 2.7 Therapie

### 2.7.1 Therapie beim Tier

Die Behandlung von Endwirten mit einer Darminfektion mit *E. multilocularis* kann mit Praziquantel (PZQ) sowie besonderer Schutzmaßnahmen erfolgen (Deplazes *et al.*, 2001; Eckert *et al.*, 2004; Eckert *et al.*, 2001). Bei der Behandlung von Hauskatzen und Hunden ist eine Risikoeinschätzung vorzunehmen und besondere Schutzmaßnahmen müssen ergriffen werden, um das Infektionsrisiko für Menschen herabzusetzen, da der Endwirt nach der Behandlung infektiöse Wurmeier mit dem Kot ausscheiden kann (Deplazes *et al.*, 2001; Eckert *et al.*, 2004; Eckert *et al.*, 2001). Praziquantel wird auch zur Behandlung von Wildkarnivoren in Bekämpfungs- und Eradikationsprogrammen verwendet (Eckert *et al.*, 2004; Eckert *et al.*, 2001; Tackmann *et al.*, 2001). Auf Grund einer Präpatenzzeit von etwa 28 Tagen (beim Hund) wird eine Verabreichung des Medikaments während eines Bekämpfungsprogramms ca. alle vier Wochen empfohlen (Craig *et al.*, 2017; Eckert *et al.*, 2001).

Für die Behandlung von AE in Fehl- und Zwischenwirten können Benzimidazole (BMZ) und Albendazol (ABZ) verwendet werden (Corsini *et al.*, 2015; Deplazes *et al.*, 2001; Eckert *et al.*, 2001; Geigy *et al.*, 2013). Die Behandlungsstrategie basiert meist auf dem Therapieansatz, welcher für Menschen genutzt wird (Corsini *et al.*, 2015).

### 2.7.2 Therapie beim Menschen

Bei der AE des Menschen kommt die Entfernung des befallenen Teils des Organs (Radikaloperation) unter Wegnahme der Metacestoden und aller Parasitenläsionen der betroffenen Organe in Betracht, soweit dies möglich ist (Eckert *et al.*, 2004; Kern *et al.*, 2017). Diese Therapieform kann meist angewendet werden, wenn die AE früh diagnostiziert wird und die Läsionen in den betroffenen Organen klein sind. Sie kann zur vollständigen Heilung führen, wobei sich meist eine zweijährige Chemotherapie nach der Operation anschließt (Eckert *et al.*, 2004; Kern *et al.*, 2017). Die empfohlenen Medikamente dafür sind Benzimidazole (Albendazol (ABZ) oder Mebendazol (MBZ)) (Eckert *et al.*, 2004; Hemphill *et al.*, 2014; Kern, 2010; Kern *et al.*, 2017). Weiterhin muss der Patient mindestens für einen Zeitraum von 10 Jahren nach der Resektion regelmäßig ärztlich überwacht werden (Eckert *et al.*, 2004; Hemphill *et al.*, 2014; Kern *et al.*, 2017).

Im Fällen von nicht oder nur teilweise operabler AE ist eine Langzeitchemotherapie mit ABZ oder MBZ möglich (Eckert *et al.*, 2004; Hemphill *et al.*, 2014; Kern *et al.*, 2017). In Abhängigkeit vom Krankheitsverlauf kann eine lebenslange Verabreichung der Medikamente notwendig sein (Eckert *et al.*, 2004; Hemphill *et al.*, 2014; Kern *et al.*, 2017). Dabei ist zu beachten, dass diese Therapeutika eine parasitostatische Wirkung besitzen, jedoch den Parasiten nicht notwendigerweise abtöten (Eckert *et al.*, 2004; Hemphill *et al.*, 2014; Kern *et al.*, 2017). In allen oben beschriebenen Therapieansätzen wird eine Nachverfolgung und regelmäßige ärztliche Überwachung der Patienten empfohlen (Eckert *et al.*, 2004; Hemphill *et al.*, 2014; Kern *et al.*, 2017).

## 2.8 Epidemiologie

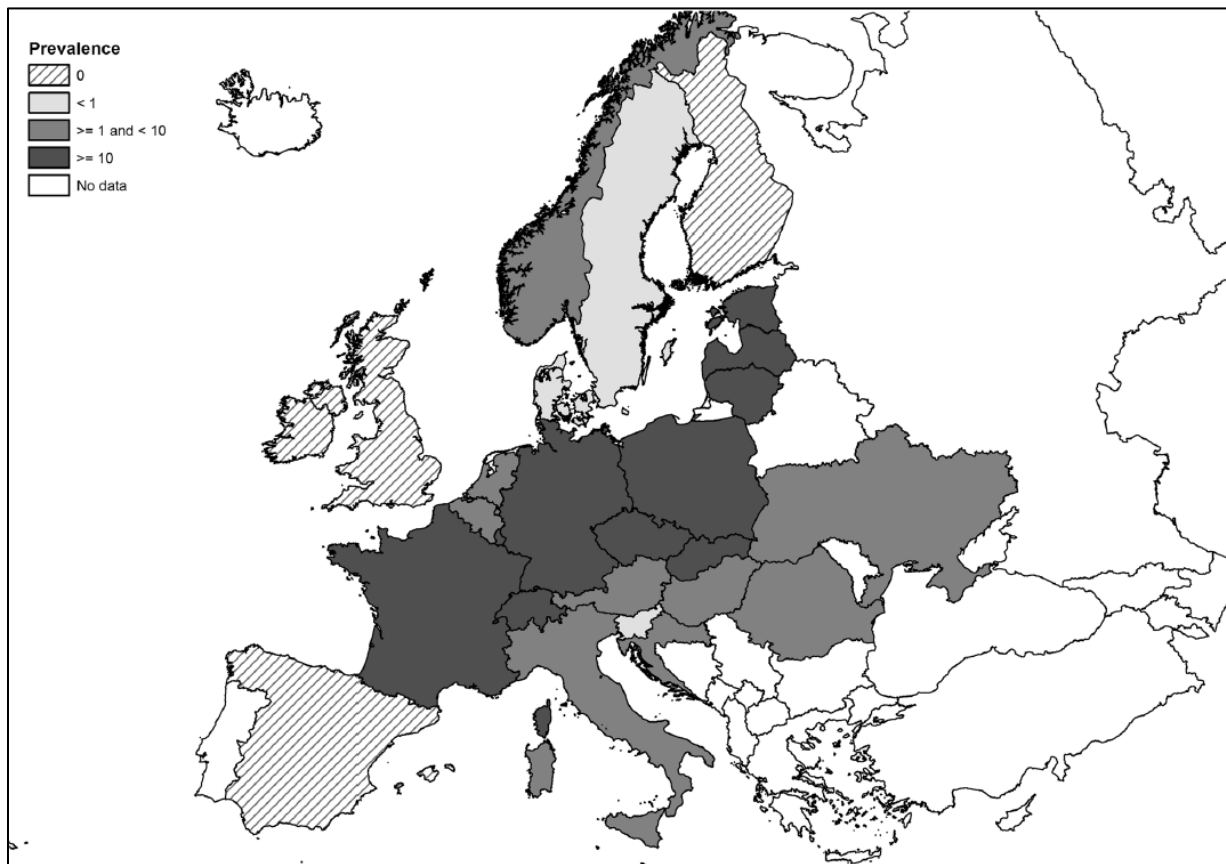
### 2.8.1 Epidemiologie in Wildtieren

Bisher scheint das Vorkommen von *E. multilocularis* auf die nördliche Hemisphäre der Erde begrenzt zu sein. Historische endemische Gebiete in Europa sind Österreich, die Schweiz, Frankreich und Süddeutschland (Eckert *et al.*, 2017; Kern *et al.*, 2003; Romig *et al.*, 2006). Allerdings wurde die Infektion in den letzten Jahren in zahlreichen weiteren Ländern in Europa nachgewiesen (Oksanen *et al.*, 2016).

Zum jetzigen Zeitpunkt gelten vier Länder in Europa als *E. multilocularis*-frei: Finnland, Malta, Irland und das Vereinigte Königreich (EFSA, 2015). Die Verbreitung von *E. multilocularis* und die bekannten Prävalenzen in Tieren sind in der folgenden Karte (Abbildung 1) dargestellt (Oksanen *et al.*, 2016; Possenti *et al.*, 2015). Zu beachten ist,

## Einleitung

dass in der Karte jedes Land als betroffen dargestellt wird, wenn auf seinem Territorium *E. multilocularis* gefunden wurde, auch wenn das Endemiegebiet unter Umständen nur einzelne Regionen innerhalb des jeweiligen Landes umfasst.



**Abbildung 1: Darstellung der zusammengefassten Prävalenzen von Studien ab 2000 von *E. multilocularis* in Rot- und Polarfüchsen in Europäischen Mitgliedsstaaten und benachbarten Ländern.**

Entnommen aus dem EFSA-Bericht 2015 des Projektes GP/EFSA/AHAW/2012/01: *Echinococcus multilocularis* infection in animals (Possenti *et al.*, 2015) und der Publikation von Oksanen und Kollegen (Oksanen *et al.*, 2016).

In der jüngeren Vergangenheit wurde *E. multilocularis* auch bei Endwirten in Schweden und Dänemark nachgewiesen (Deplazes *et al.*, 2017; Enemark *et al.*, 2013; Miller *et al.*, 2016; Wahlström *et al.*, 2015). Insbesondere Schweden galt zuvor als frei von der Infektion bei Endwirten. Dabei ist zu klären, ob es sich um Neueinträge des Parasiten oder um bis dato nicht erkannte Endemiegebiete handelt. Zur Bearbeitung dieser Fragestellungen wurden auch molekulare Marker herangezogen.

Der einzige bis heute gesichert aufgeklärte Neueintrag von *E. multilocularis* fand auf der japanischen Insel Hokkaido statt (Vuitton *et al.*, 2011). Über das Einbringen von vermutlich infizierten Polarfüchsen von der Kamchatka-Halbinsel, wo *E. multilocularis* natürlich vorkommt, kam es zur Einschleppung von *E. multilocularis* auf die Kurilen. Dort infizierten sich Rotfüchse, welche zur heimischen Fauna der Kurilen gehören, mit dem

Parasiten. Von 1924 bis 1926 wurden *E. multilocularis*-infizierte Rotfüchse sowohl für die Kontrolle der Wühlmauspopulation als auch zur Fellproduktion von den Kurilen auf die Insel Rebun, nordwestlich von Hokkaido, eingeführt (Inukai *et al.*, 1955; Rausch *et al.*, 1957; Satho *et al.*, 2005; Vuitton *et al.*, 2011) und brachten so *E. multilocularis* mit.

### 2.8.2 Epidemiologie der Alveolären Echinokokkose des Menschen

In Deutschland ist sowohl die zystische als auch die alveoläre Echinokokkose eine meldepflichtige Infektionskrankheit. In Abbildung 2 sind die in den Jahren 2001 bis 2017 gemeldeten Fälle der alveolären Echinokokkose aus Deutschland aufgeführt. Im Mittel wurden in diesem Zeitraum 28 Neuerkrankungen pro Jahr gemeldet. (Quelle RKI, survstat, <https://survstat.rki.de/>).

Das Nicht-Melden bestätigter Fälle (Underreporting) ist ein wichtiger Punkt in der Bewertung der Epidemiologie der menschlichen AE-Fälle und stellt ein großes Problem dar, da es zur Fehleinschätzung der epidemiologischen Situationen kommen kann (Jorgensen *et al.*, 2008).

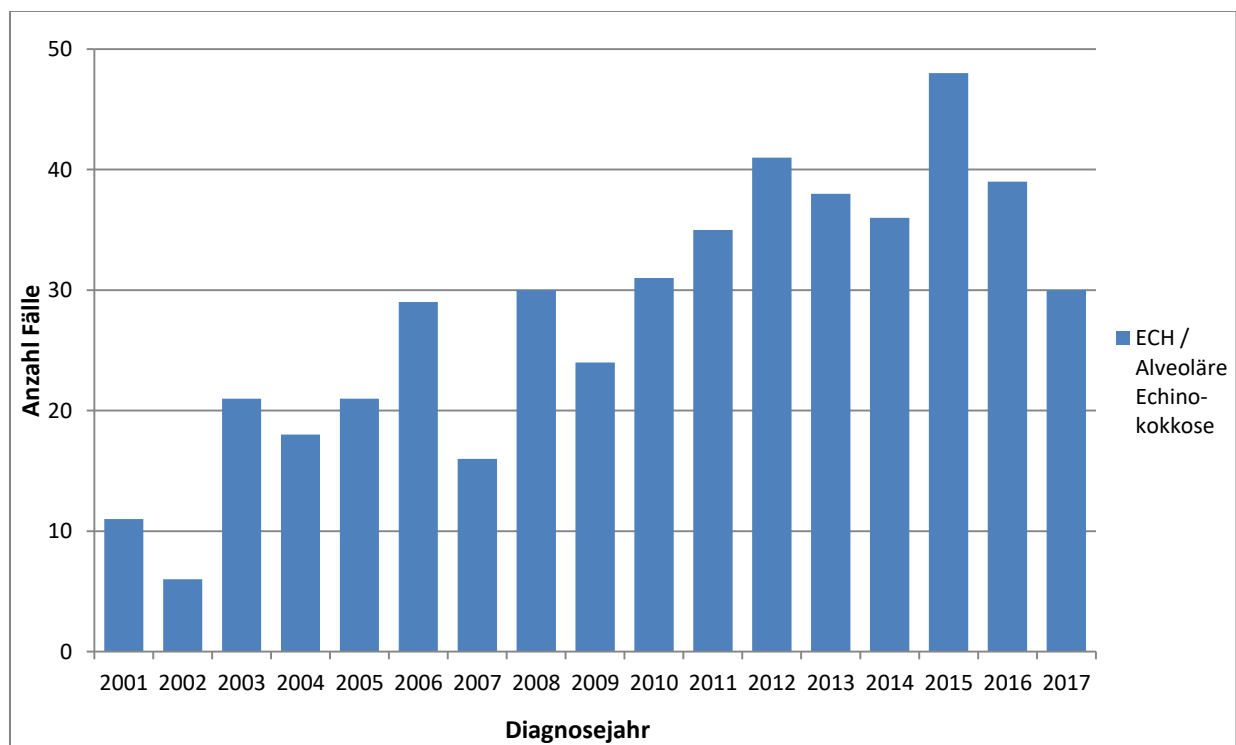


Abbildung 2: Gemeldete Alveoläre Echinokokkose-Fälle pro Jahr in Deutschland basierend auf den Daten des RKI (survstat, <https://survstat.rki.de/>).



## Einleitung

---

Eine weitere Schwierigkeit besteht in der großen Spanne der Inkubationszeit beim Menschen. Die Inkubationszeit wird von Monaten bis zu vielen Jahren angegeben (Robert Koch-Institut, 2014). Sie ist jedoch insgesamt schwer zu ermitteln, weil der genaue Zeitpunkt der Exposition, der zur Infektion geführt hat, in der Regel unbekannt ist und sich nur schwer abschätzen lässt. Weiterhin ist es in der Regel nicht möglich, die genaue Infektionsquelle zu eruieren. Aus den Daten des Robert Koch-Instituts lässt sich ableiten, dass in Deutschland rund 28 Neuerkrankungen von AE pro Jahr gemeldet werden (Robert Koch-Institut, 2014, 2017). Die tatsächliche Zahl könnte jedoch ca. drei Mal höher liegen (Jorgensen *et al.*, 2008).

## 2.9 Genomaufbau

Das Genom von *E. multilocularis* ist ein diploider Chromosomensatz, welcher auf neun Chromosomen aufgeteilt ist und etwa 115 Millionen Basenpaare (Mbp) umfasst (Rausch *et al.*, 1981; Tsai *et al.*, 2013). Diese kodieren für 10.231 bis 12.490 mutmaßliche Gene (Tsai *et al.*, 2013). Wie auch von anderen Cestoden-Genomen bekannt, werden bei *E. multilocularis* bis zu vier Gene über polycistronische mRNA verschlüsselt. Die Anordnung der Gene in den polycistronischen Sequenzen ist sehr ähnlich zu der Genanordnung in *Taenia solium* (Schweinefinnenbandwurm) und *Hymenolepis microstoma* (ein Bandwurm bei Nagetieren) (Tsai *et al.*, 2013).

## 2.10 Mitochondriales Genom

Das Mitochondrium ist die wichtigste energieliefernde Zellorganelle und beinhaltet ein eigenes Genom in Form von DNA (mtDNA). Das mitochondriale Genom von *E. multilocularis* liegt als zirkulär-geschlossenes Molekül vor und umfasst 13.738 Basenpaare (bp) mit einem Guanin (G) + Cytosin (C) -Gehalt (GC-Gehalt) von 31 % (Nakao *et al.*, 2002). Der GC-Gehalt hat einen Einfluss auf den genetischen Code sowie auf den Gebrauch der Codons (Codon Usage). Der Codon Usage gibt an, wie oft bestimmte Codons für das Kodieren einer Aminosäure genutzt werden, wenn mehrere Codons die gleiche Aminosäure kodieren. Das mitochondriale Genom kodiert 36 Gene, welche Informationen für 12 Proteine, zwei ribosomale Ribonukleinsäuren (rRNA) und 22 Transfer-RNAs (tRNA) verschlüsseln (Nakao *et al.*, 2002). Bei den 12 Proteinen handelt es sich um die Adenosintriphosphatsynthase-Untereinheit 6 (ATPase, ATP6), das Cytochrom-b (Cytb), die Cytochrom-c-Oxidase-Untereinheiten 1 bis 3 (Cox 1-3) und die

Nicotinamidadenindinukleotid-Dehydrogenase-Untereinheiten 1 bis 6 (NADH-Dehydrogenase, nd1-6 und L4). Insgesamt umfassen die 12 kodierenden Gene 10.053 bp und somit 73,2 % der gesamten Genomlänge. Weiterhin beinhaltet das mitochondriale Genom zwei große nicht-kodierende Regionen. Es gibt nur eine Transkriptionsrichtung, in welcher alle Gene abgelesen und umgeschrieben werden, da alle Gene auf demselben Strang der mtDNA kodiert werden. Typischerweise beinhaltet das mitochondriale Genom von *E. multilocularis* keine Introns in den Proteinsequenzen. Introns sind nicht kodierende Sequenzabschnitte innerhalb eines Gens. Die Abtrennung der meisten Gene erfolgt über wenige DNA-Basen (Nakao *et al.*, 2002). Die Anordnung der mitochondrialen Gene ist identisch mit der Anordnung im mitochondrialen Genom von *T. crassiceps* und *E. granulosus* (Nakao *et al.*, 2002).

### 2.11 Genotypen von *Echinococcus multilocularis*

Obwohl Genotypen von *E. granulosus* definiert wurden und sie mehr oder weniger eindeutig bestimmten End/Zwischenwirt-Kombinationen zugeordnet werden konnten, besteht eine anhaltende Diskussion darüber, ob es gerechtfertigt ist, verschiedene Genotypen von *E. multilocularis* zu unterscheiden und wie sie ggf. charakterisiert werden können (Lymbery, 2017). Die ersten Genotypisierungen erfolgten mit Hilfe des mitochondrialen Markers *cox1* durch Bowles 1992 (Bowles *et al.*, 1992) und ein Jahr später von Bowles und McManus (Bowles *et al.*, 1993b). Sie beruhten nur auf wenigen Nukleotidunterschieden, sodass nur eine Einteilung in zwei geografisch getrennte Genotypen möglich war. Diese wurden als Genotyp M1 bezeichnet, welcher Isolate aus China, Alaska und Nordamerika beinhaltet, und als Genotyp M2, welcher Isolate aus Europa einschließt. Die Einteilung wurde 1997 von Rinder (Rinder *et al.*, 1997) mittels eines nuklearen 18S rRNA-Markers bestätigt. Dagegen wiesen Haag und Kollegen 1997 (Haag *et al.*, 1997) darauf hin, dass die Einteilung in einen europäischen und in einen nordamerikanischen Stamm von *E. multilocularis* nochmals überprüft werden sollte. Dies schlussfolgerten sie aus den Ergebnissen der Untersuchung mit einem Homeoboxgen-Marker von Vispo und Ehrlich 1994 (Vispo *et al.*, 1994). Mit diesem Marker konnten die Proben ebenfalls in zwei Gruppen unterteilt werden. Die eine Gruppe beinhaltete Proben, welche weltweit verbreitet und die andere Gruppe solche, die nur auf der St. Lorenz-Insel gefunden worden waren (Haag *et al.*, 1997). Diese kontroversen Ergebnisse weisen auf die Notwendigkeit der Entwicklung neuer Werkzeuge für die Genotypisierung von *E. multilocularis* hin.

## Einleitung

---

1996 wurden erste Arbeiten von Bretagne und Kollegen zu einer Klassifizierung von *E. multilocularis* mit Hilfe von Mikrosatelliten veröffentlicht (Bretagne *et al.*, 1996). Der Zielbereich des Markers lag innerhalb des Gens, welches für die Untereinheit 1 der kleinen nuklearen RNA kodiert. Diese Arbeiten bestätigten die Unterschiede zwischen den geografischen Gebieten Nordamerika/Alaska und Europa und deuteten auf eine geringere Variabilität innerhalb von *E. multilocularis* im Vergleich zu *E. granulosus* hin.

Zehn Jahre nach dem Erscheinen der Arbeit von Bretagne *et al.* (Bretagne *et al.*, 1996) entwickelten Bart und Kollegen 2006 (Bart *et al.*, 2006) einen neuen Mikrosatelliten-Marker namens EmsB. Mit diesem Marker ist es möglich, die Isolate nicht nur in die Nordamerika/Alaska-Gruppe und in die Europa-Gruppe einzuteilen, sondern auch unterschiedliche Gruppen innerhalb Europas zu bilden (Bart *et al.*, 2006). Das Motiv des Markers ist eine Tandem-Wiederholung aus (CA)<sub>m</sub> und (GA)<sub>n</sub>, gefolgt von einem GGTG-Sequenzabschnitt, an den sich eine Wiederholung von (GA)<sub>o</sub> anschließt (Bart *et al.*, 2006). M, n und o stellen dabei die Anzahl der Wiederholungen (Repeats) dar. Diese Wiederholungen können die gleiche Anzahl aufweisen. Dadurch sind unterschiedliche Fragmentlängen im Bereich von 209 bis 247 bp (Bart *et al.*, 2006) dieser EmsB-Amplifikate nachweisbar. Die Genotypen setzen sich aus einer bestimmten Anzahl verschiedener Maxima bei bestimmten Fragmentlängen zusammen.

Der EmsB-Marker fand inzwischen regen Einsatz bei der Genotypisierung, insbesondere bei Isolaten aus Europa. Mit Hilfe dieses Markers zeigte sich eine größere Diversität der „Genotypen“ von *E. multilocularis* im Vergleich zur ermittelten Diversität mit den bis dahin bekannten Methoden. Anfänglich definierten Bart und Kollegen 25 Genotypen, von denen 20 in Europa zu finden sind (Bart *et al.*, 2006). Knapp und Kollegen teilten die von ihnen untersuchten Parasiten in fünf Haupttypen ein, welche als Profile bezeichnet werden (Knapp *et al.*, 2007). Die fünf Profile für Europa sind das Profil D, welches sich in vier eng verwandte Genotypen aufspaltet, die Profile E, F, G und H (Knapp *et al.*, 2007). 2009 wurden insgesamt 32 Profile in Europa nachgewiesen (Knapp *et al.*, 2009). Kürzlich fanden Valot und Kollegen (2015) mit Hilfe der *In-silico*-PCR weitere potentielle Profile (Valot *et al.*, 2015). Weiterhin konnten die Autoren mit dieser Methode feststellen, dass der Marker auf dem Chromosom 5 des *E. multilocularis*-Genoms lokalisiert ist (Valot *et al.*, 2015).

### 3. Ziel der vorliegenden Arbeit

Der Zestode *Echinococcus multilocularis* verursacht eine gefährliche Zoonose, die Alveoläre Echinokokkose des Menschen. Der vorwiegend sylvatische Lebenszyklus des Parasiten beinhaltet einen obligatorischen Wirtswechsel. Der Hauptwirt ist in Europa der Rotfuchs (*Vulpes vulpes*). Als natürlicher Zwischenwirt dienen verschiedene Nagetierspezies, insbesondere Wühlmäuse (*Arvicolidae*). Die phylogenetische Einordnung sowie die genetische Diversität von *E. multilocularis* sind bis heute umstritten (Lymbery, 2017; Thompson, 2017). Damit verbunden ist auch eine Diskussion über den möglichen Einfluss der geografischen Herkunft von Exemplaren des Parasiten auf seine Einordnung in bestimmte Genotypen.

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, mit Hilfe von drei mitochondrialen Markern – Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit 1 (cox1), NADH-Dehydrogenase Untereinheit 1 (nd1) und der ATP-Synthase Untereinheit 6 (atp6) – und des EmsB Mikrosatelliten-Markers eine Genotypisierung von Proben aus einem begrenzten geografischen Raum durchzuführen. Für diese Untersuchungen wurden mittels parasitologischer Darmuntersuchungen der Befall der Füchse mit *E. multilocularis* bestimmt und 101 infizierte Tiere ausgewählt. Insgesamt wurden 91 Füchse aus Brandenburg und 10 aus Nordrhein-Westfalen für die Untersuchungen herangezogen. Von jedem Fuchs wurden fünf adulte *E. multilocularis*-Isolate aus der Darmmukosa isoliert und für die molekularbiologischen Untersuchungen genutzt. Somit wurden insgesamt 505 Wurmisolate anhand von vier Markern analysiert. Die Sequenzen aller mitochondrialen Marker wurden auf Nukleotidpolymorphismen geprüft und für phylogenetische Untersuchungen genutzt. Mit Hilfe des EmsB-Markers, der im kernständigen Genom des Parasiten lokalisiert ist, wurden Längenpolymorphismen bestimmt und anhand von Elektropherogrammen unterschiedlichen Profilen zugeordnet. Die ermittelten Profile sollten anschließend mit zwei verschiedenen Methoden verifiziert werden. Folgende Thesen wurden anhand der Genotypendaten, die mit den vier Markern erhoben wurden, und dem Herkunftsort der Füchse überprüft:

1. Die vier verwendeten Marker sind zur Genotypisierung von Proben aus einem begrenzten endemischen Gebiet verwendbar.
2. Die Verteilung der Genotypen von *E. multilocularis* ist heterogen im Endemiegebiet des Parasiten in Brandenburg.
3. Ein einzelner Fuchs kann gleichzeitig mehrere Genotypen beherbergen.

4. Die Proben aus Brandenburg und Nordrhein-Westfalen gehören zum europäischen Haplotyp von *E. multilocularis*.

### 4. Material und Methoden

#### 4.1 Materialien

##### 4.1.1 Untersuchungsmaterial

Im Zeitraum 2009 bis 2012 wurden insgesamt 5954 Rotfüchse im Land Brandenburg mittels parasitologischer Darmuntersuchung auf den Befall mit *E. multilocularis* und anderen Darmparasiten untersucht. Die Proben stammten zum größten Teil von der Jagdstrecke, aber auch Fallwildfunde wurden in die Untersuchung mit einbezogen. Die Rotfüchse wurden von Jägern in Brandenburg erlegt und an vier Sammelpunkten abgegeben. Weitere Fuchsdarmproben wurden vom Landeslabor Berlin-Brandenburg zur Verfügung gestellt. Die Zuordnung der Tiere erfolgte über das Streckungs- bzw. Funddatum. Jeder Fuchs erhielt eine eindeutige Eingangsnummer, bestehend aus der Bezeichnung des Tieres, in diesem Fall „Fu“ für Fuchs, dem Jahr des Erlegungsdatums, sowie einer fortlaufenden fünfstelligen Zahl beginnend mit 00001. Daraus ergibt sich zum Beispiel eine Fuchsnummer Fu/2009/02771. Die tierbezogenen Daten wurden in einer Datenbank erfasst. In dieser wurden folgende Daten gespeichert:

- Eingangsdatum
- Erlegungsdatum
- Fund- bzw. Erlegungsort (gegebenenfalls mit den geografischen Koordinaten)
- Geschlecht (männlich, weiblich oder unbekannt)
- Alter (adult, juvenil oder unbekannt)
- Beobachtungen (abgemagert, Räude, keine Beobachtung oder unbekannt)

Nach den Untersuchungen wurden weitere Daten zu folgenden Variablen in die Datenbank aufgenommen:

- Sektionsdatum
- Untersuchungsdatum
- Entnommene Proben:
  - Serum
  - Kot
- Anzahl der untersuchten Darmausstriche
- Echinokokken-Anzahl
- Echinokokken-Befund (positiv oder negativ)
- WHO-Klassifizierung hinsichtlich der Intensität des Befalls mit *E. multilocularis*

## Material und Methoden

---

- Klassifizierung des Befalls mit folgenden Darmparasiten:
  - *Mesocestoides spp.*
  - *Taenia spp.*
  - Ascariden
  - Ancylostomatiden
  - Trematoden
- ELISA-Datum
- ELISA-Befund
- Antikörpereinheiten

Für die molekularbiologischen Untersuchungen hinsichtlich der Genotypisierung der Echinokokken waren nur die Echinokokken-positiven Füchse relevant. Unter diesen wurden nur Proben von Füchsen mit einer Befallszahl von mehr als fünf adulten oder präadulten Exemplaren von *E. multilocularis* (Tabelle 8) für die Untersuchung verwendet.

Im Zeitraum 2009 bis 2012 wurde bei 791 Rotfüchsen *E. multilocularis* gefunden. 584 Füchse wiesen eine Befallsintensität von mehr als 5 Parasiten auf. 35 Tieren konnte in diesem Zeitraum kein positiver oder negativer Befund zugeordnet werden (nicht untersuchungsfähige Tiere bzw. Därme oder nicht eindeutig identifizierbare Proben).

Für die Genotypisierung wurden schließlich insgesamt 91 Füchse aus Brandenburg und 10 Füchse aus Nordrhein-Westfalen ausgewählt. Die Proben aus Nordrhein-Westfalen stammten aus einem Jagdbezirk im Rhein-Sieg-Kreis und wurden als „Outgroup“ verwendet.

Des Weiteren stellten Frau Dr. Jenny Knapp und Herr Professor Dr. Bruno Gottstein fünf DNA-Proben von fünf verschiedenen *E. multilocularis*-Isolaten aus der Schweiz für die EmsB-Analysen als Kontrollen zur Verfügung (Tabelle 1).

**Tabelle 1: Proben aus der Schweiz und die ihnen zugeordneten Profile.**

Probennummer	DNA-Konzentration [µg/ml]	Datum Probennahme	Profil
CH 1	455	09.09.1986	G
CH 5	309	02.09.1986	F
CH 6	253	06.08.1986	H
CH 11	444	17.09.1986	H
CH 22	338	29.09.1986	E

### 4.1.2 Primer

Die für die molekularbiologischen Arbeiten verwendeten Primer sind in Tabelle 2 aufgelistet. Die mit a gekennzeichneten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins Genomics, Ebersberg, synthetisiert, die mit b gekennzeichneten Primer wurden von der Firma Sigma-Aldrich, Hamburg, hergestellt.

**Tabelle 2: Verwendete Primer**

Name	Nukleotidsequenz in 5' → 3' Orientierung	Größe	Einsatz	Quelle
co1 for <sup>a</sup>	TTG AAT TTG CCA CGT TTG AAT GC	23 b	Amplifikation Cytochrom-c- Oxidase 1	Xiao <i>et al.</i> 2003 (Xiao <i>et al.</i> , 2003)
co1rev <sup>a</sup>	GAA CCT AAC GAC ATA ACA TAA TGA	24 b	Amplifikation Cytochrom-c- Oxidase 1 und Sequenzierung	Xiao <i>et al.</i> 2003 (Xiao <i>et al.</i> , 2003)
nd1 for (JB11) <sup>a</sup>	AGA TTC GTA AGG GGC CTA ATA	21 b	Amplifikation NADH- Dehydrogenase 1	Bowles und Mc Manus <i>et al.</i> 1993 (Bowles <i>et al.</i> , 1993b)
nd1 rev (JB12) <sup>a</sup>	ACC ACT AAC TAA TTC ACT TTC	21 b	Amplifikation NADH- Dehydrogenase 1 und Sequenzierung	Bowles und Mc Manus <i>et al.</i> 1993 (Bowles <i>et al.</i> , 1993b)



## Material und Methoden

Name	Nukleotidsequenz in 5' → 3' Orientierung	Größe	Einsatz	Quelle
atp1st for <sup>a</sup>	GTT GTC CGT TAA ATT TCT TTT AGC	24 b	Amplifikation ATP-Synthase 6	Wasser mann, Unveröff fentlicht
atp1st rev <sup>a</sup>	GGA ATA ATT GCT AAC CTA CAC AAC	24 b	Amplifikation ATP-Synthase 6 und Sequenzierung	Wasser mann, unveröff entlicht
EmsB A for <sup>b</sup>	GTG TGG ATG AGT GTG CCA TC	20 b	Amplifikation Mikrosatelliten EmsB	Bart <i>et al.</i> 2006 (Bart <i>et al.</i> , 2006)
EmsB C rev <sup>b</sup>	[6FAM]CCA CCT TCC CTA CTG CAA TC	20 b + Fluorea szenz- farb- stoff	Amplifikation Mikrosatelliten EmsB und Längenbestim- mung der Amplifikate	Bart <i>et al.</i> 2006 (Bart <i>et al.</i> , 2006)

### 4.1.3 Verbrauchsmaterial

Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
2 ml Hülse aus PE-LD	CKW, Gesellschaft f. Kunststoffverarbeitung mbH, Catterfeld
Eindrückstopfen für 2 ml Hülse	CKW, Gesellschaft f. Kunststoffverarbeitung mbH, Catterfeld
LIGHTrun Sequenzing Barcodes	GATC Biotech AG, Köln
Objektträger 76 x 20 mm	MARIENFELD, Lauda-Königshofen
Petrischalen, viereckig, 100 x 100 x 20 mm	SARSTEDT, Nümbrecht

## Material und Methoden

Bezeichnung	Hersteller
Pipettenspitzen:	
- 1.000 µl	Starlab, Hamburg
- 1.000 µl mit Filter	Biozym, Hessisch Oldendorf
- 200 µl	Starlab, Hamburg
- 200 µl mit Filter	Biozym, Hessisch Oldendorf
- 100 µl mit Filter	Biozym, Hessisch Oldendorf
- 20 µl mit Filter	Biozym, Hessisch Oldendorf
- 10 µl	Peqlab, VWR, Erlangen
- 10 µl mit Filter	Biozym, Hessisch Oldendorf
Reaktionsgefäße:	
- 2,0 ml	SARSTEDT, Nümbrecht
- 1,5 ml	Greiner Bio-One, Frickhausen
- 1,5 ml Safe-Lock Tubes	EPPENDORF, Hamburg
- 0,5 ml	Biozym, Hessisch Oldendorf
- 0,2 ml	Greiner Bio-One, Frickhausen
Zentrifugenröhrchen 50ml	SARSTEDT, Nümbrecht

### 4.1.4 Technische Ausstattung

**Tabelle 4: Verwendete Geräte**

Bezeichnung	Hersteller
Anatomisches Skalpell, rostfrei	RSG Rostfrei-Schneidwerkzeuge GmbH, Solingen
Durchlichtmikroskop CH2	Olympus, Hamburg
Gefrierschrank G5216-21, -14 °C bis -28 °C	Liebherr, Biberach an der Riss
Geldokumentationsgerät GenoPlex	VWR, Darmstadt
Gelelektrophoresekammer Agagel Maxi	Biometra, Göttingen
Heraeus Megafuge 1.0 R	Thermo Fisher Scientific Germany, Braunschweig
Kühlschrank, +2 °C bis +10 °C	Liebherr, Biberach an der Riss
Labor-pH-Meter 766	Knick, Berlin
Magnetrührer RCT basic	IKA-Labortechnik, Staufen
Messbecher, konische Form, PP	Behr Labor-Technik GmbH, Düsseldorf

## Material und Methoden

Bezeichnung	Hersteller
Mikroskopier-Schere, warm geschmiedet	RSG Rostfrei-Schneidwerkzeuge GmbH, Solingen
Mikrowelle Hanseatic	OTTO, Hamburg
NanoPhotometer P330	Implen GmbH, München
PCR Thermocycler FlexCycler	Analytik Jena AG, Jena
PCR/UV-Workstation	LTF Labortechnik GmbH & Co. KG, Wasserburg/Bodensee
Pipetten:	
- 0,5 – 10 µl	Thermo Fisher Scientific Germany, Braunschweig
- 5 – 50 µl	Thermo Fisher Scientific Germany, Braunschweig
- 40 – 200 µl	Thermo Fisher Scientific Germany, Braunschweig
- 200 – 1000 µl	Thermo Fisher Scientific Germany, Braunschweig
- 0,2 – 2 µl	VWR, Darmstadt
- 0,5 – 10 µl	VWR, Darmstadt
- 2 – 20 µl	VWR, Darmstadt
- 10 – 100 µl	VWR, Darmstadt
- 20 – 200 µl	VWR, Darmstadt
- 100 – 1000 µl	VWR, Darmstadt
Präpariernadeln, Remanit 4301	RSG Rostfrei-Schneidwerkzeuge GmbH, Solingen
Präzisionswaage PFB 200-3	Kern Waagen, Balingen-Frommern
Rotilabo®-Glasstäbe	Carl Roth, Karlsruhe
Schüttler	IKA-Labortechnik, Staufen
Sequenziergerät ABI 3130	Applied Biosystems® Thermo Fisher Scientific Germany, Braunschweig
Sprout Mini-Zentrifuge	Biozym, Hessisch Oldendorf
Stromversorgungsgerät Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Stumpfe Pinzette, Remanit 4301	RSG Rostfrei-Schneidwerkzeuge GmbH, Solingen
Swibo Auslöse- / Ausbeinmesser 201-18 cm, starre Klinge	Hugo Bergmann GmbH, Wuppertal
TECHNIVAL 2 Stereomikroskop	JENOPTIK Jena GmbH, Jena
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Tiefkühltruhe New Brunswick	Eppendorf, Hamburg

## Material und Methoden

Bezeichnung		Hersteller
Verbandscheren,	Chromstahl	RSG Rostfrei-Schneidwerkzeuge GmbH, Solingen
1.4021		
Waage SCOUT SC6010, 600 g		OHAUS, Parsippany (USA)
Zentrifuge 5415 D		Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5424		Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5430 R		Eppendorf, Hamburg

### 4.1.5 Chemikalien, gebrauchsfertige Produkte und Testsubstanzen

Tabelle 5: Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Borsäure	Roth, Karlsruhe
DEPC	Roth, Karlsruhe
EDTA	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ficoll 400	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
LE Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
NaOH (Pellets)	Roth, Karlsruhe
Orange G	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe

Tabelle 6: Kommerziell erhältliche Testkits und gebrauchsfertige Produkte

Bezeichnung	Hersteller	Einsatz
100 bp Marker	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Germany, Braunschweig	Gelelektrophorese
BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific Germany, Braunschweig	Sequenzierung
dNTP Set	STRATEC Molecular GmbH, Berlin	PCR
Hi-Di™ Formamide	Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific Germany, Braunschweig	Sequenzierung

## Material und Methoden

Bezeichnung	Hersteller	Einsatz
High Pure PCR Template Preparation	ROCHE, Mannheim	DNA-Extraktion
NucleoSpin® Tissue Kit	MACHEREY-NAGEL GmbH, Düren	DNA-Extraktion
Platinum® Taq DNA Polymerase	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Germany, Braunschweig	PCR
POP7 Polymer	NimaGen B.V., Nijmegen, (Niederlande)	Mikrosatellitenbestimmung
QIAquick® PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden	Aufreinigung der PCR-Produkte
Red 600 Marker	NimaGen B.V., Nijmegen, (Niederlande)	Mikrosatellitenbestimmung
SigmaSpin Sequencing Reaction Clean-Up, Post-Reaction Clean-Up Columns	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg	Aufreinigung Sequenzierungsprodukte

### 4.1.6 Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen für molekularbiologische Arbeiten:

0,5 × TBE-Puffer:	100 ml 5 × TBE-Puffer + 900 ml Aqua bidest.
10 × TBE-Puffer:	24,20 g Tris + 1,86 g EDTA auf 500 ml mit Aqua bidest. auffüllen
5 × Orange G:	0,125 g Orange G + 15,00 g Ficoll 400 + 50 ml 10 × TBE-Puffer auf 500 ml mit Aqua bidest. auffüllen
5 × TBE-Puffer:	54 g TRIS + 27,5 g Borsäure + 20 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 auf 1.000 ml mit Aqua bidest. auffüllen
Agarosegel 1,5 %ig:	1,5 g Agarose in 100 ml 0,5 × TBE-Puffer + 10 µl Ethidiumbromid (5 mg/ml)
DEPC-Wasser:	1 ml DEPC in 1.000 ml Aqua bidest.

Lösung für parasitologische Arbeiten:

NaCl 0,9 %ig (physiologische Kochsalzlösung):	9 g NaCl auf 1000 ml mit Aqua bidest. auffüllen
---	---

### 4.1.7 Software

Tabelle 7: Verwendete Programme und Software

Bezeichnung	Verwendung
ArgGIS 10.2.2	Geografische Darstellung und Auswertung
EndNote X8	Erstellung des Literaturverzeichnisses
Geneious® 10.2	Sequenzauswertung
GeneMapper® Software 5	Mikrosatellitenauswertung
Geno Capture	Geldokumentation und Auswertung der Gelbilder
Mega 6	Phylogenetische Auswertung der Daten
Microsoft® Excel 2010	Datenauswertung, statistische Auswertung
Mikrosoft® Word 2010	Textverarbeitung
R 3.1.0	Statistische Auswertung
SaTScan v9.3.1	Statistische Auswertung räumlicher Daten
Wild Datenbank	Datenmanagement

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Pathologische Arbeiten

Vor der Untersuchung wurden Tierkadaver und Därme für mindestens eine Woche bei -80 °C gefroren, um potentiell vorhandene infektiöse *E. multilocularis*-Eier abzutöten. Fuchskadaver wurden zunächst seziiert. Dabei wurden zu jedem Tierkörper jeweils Alter, Geschlecht und der Allgemeinzustand dokumentiert. Anschließend wurde das Abdomen eröffnet und cranial des Diaphragmas Pleuraflüssigkeit gewonnen und asserviert. Weiterhin wurde vom Pylorus beginnend bis hin zum Anus das Intestinum entnommen. Im Rectum enthaltener Kot wurde zurückgeschoben, sodass er möglichst nicht austrat. Das Intestinum wurde danach noch einmal für eine Woche bei -80 °C durchgefroren und anschließend bei -20 °C bis zur weiteren parasitologischen Untersuchung gelagert.

### 4.2.2 Parasitologische Arbeiten

#### 4.2.2.1 Intestinal Scraping Technique (IST)

Zur Vorbereitung auf die Untersuchung mittels IST wurden die bei -20 °C gelagerten Därme bei RT über Nacht aufgetaut. Das Gekröse wurde vom Darm abgetrennt, sodass der Darm in gleichlange Schlingen auf dem Untersuchungstisch ausgebreitet werden

## Material und Methoden

konnte. Daraufhin wurde der Bereich vom Magenausgang bis hin zum Appendix in drei gleich große Stücke geteilt. Zudem wurden der Blinddarm und der Enddarm abgetrennt. Anschließend wurde der Darm längs eröffnet und auseinandergestrichen. Nachdem der grobe Darminhalt vorsichtig entfernt worden war, erfolgte eine makroskopische Untersuchung auf makroskopisch sichtbare Darmparasiten. Diese wurden bestimmt und gezählt. Die Befunde wurden im Untersuchungsprotokoll dokumentiert.

Es folgte die Entnahme von neun Abstrichen der Schleimhaut vom letzten Drittel des Darmes mittels Objektträgern. Dabei wurden die Objektträger über die Schleimhaut gezogen und die dadurch entfernte Schleimhaut in eine quadratische Petrischale gegeben. Anschließend wurden die Objektträger auf die geschabte Masse gelegt und angedrückt, sodass die Ausstriche unter dem Stereomikroskop mäanderförmig nach Echinokokken oder graviden Endgliedern durchmustert werden konnten. Wurden Echinokokken gefunden, so wurden diese in allen neun Abstrichen gezählt und die Befallsintensität folgendermaßen klassifiziert (Klassifizierung nach Tackmann *et al.* (Tackmann *et al.*, 2006)):

**Tabelle 8: Klassifizierung der Befallsintensität**

Klasse	Echinokokken-Anzahl	Befallsintensität
1	1 – 5	+
2	6 – 50	++
3	51 – 1000	+++
4	> 1000	++++

Anschließend wurde die verbliebene Schleimhaut ebenfalls mit Objektträgern abgeschabt, die gesamte Schleimhaut in 2 ml Portionen aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Bei einem negativen Befund wurden nochmals sechs Abstriche vom letzten Drittel angefertigt und durchmustert. Konnten in diesen Ausstrichen Echinokokken detektiert werden, wurde die Anzahl der Echinokokken und Ausstriche im Protokoll notiert und die Schleimhaut ebenfalls in 2 ml Portionen tiefgefroren aufbewahrt. Wurden keine Echinokokken gefunden, so galt der Fuchs als nicht mit *E. multilocularis* infiziert (negativ).

### 4.2.2.2 Sedimentation and Counting Technique (SCT)

Für die SCT wurde entweder die bereits durch die IST abgeschabte Schleimhaut genutzt oder die Schleimhaut von noch nicht voruntersuchten Därmen verwendet. Die Darmmukosa wurde, wie in 4.2.2.1 beschrieben, abgestrichen und in einen konischen Messbecher (1000 ml) überführt. Anschließend wurde die Schleimhaut in 1 l physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und für 30 Minuten sedimentiert. Es folgten ein Dekantier-Schritt sowie das erneute Suspendieren in 1 l physiologischer Kochsalzlösung. Die Abfolge des Suspendierens, Sedimentierens und Dekantierens wurde insgesamt drei Mal vollzogen. Anschließend wurde das verbleibende Sediment so portioniert in Petrischalen gegeben, dass die Flüssigkeit nicht zu stark getrübt war und mit Hilfen eines Stereomikroskops mäanderartig durchmustert werden konnte. Das Sediment wurde auf Echinokokken und andere Darmparasiten untersucht und das Ergebnis (Taxon, Anzahl) in das Protokoll eingetragen. Das untersuchte Sediment wurde anschließend in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei -20 °C gelagert.

### 4.2.3 Molekularbiologische Arbeiten

#### 4.2.3.1 DNA-Isolierung

Für die DNA-Isolierung wurde das High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche®, Mannheim, Deutschland) verwendet. Hierzu wurde die zu bearbeitende Schleimhautprobe aufgetaut und in eine Petrischale überführt. Von jedem zu untersuchenden Fuchs wurden fünf adulte *E. multilocularis*-Würmer einzeln mit Hilfe einer Präpariernadel entnommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, in dem 200 µl Lyse-Puffer vorgelegt waren. Nach der Zugabe von 40 µl Proteinase K-Lösung und dem Mischen mit Hilfe eines Schüttlers (Vortex 1, IKA-Labortechnik, Staufen, Deutschland) schloss sich eine Inkubation bei 55 °C und 650 rpm über Nacht an. Anschließend wurden 200 µl Bindungspuffer hinzugegeben und die Probe gemischt. Es folgte ein weiterer Inkubationsschritt bei 70 °C für 10 Minuten bei 650 rpm. Nach der Zugabe von 100 µl Isopropanol und dem Mischen der Probe wurde die Flüssigkeit in das obere Pufferreservoir des High Pure Filter-Gefäßes überführt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 8000 x g für 60 s in einer Zentrifuge (Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Bei den folgenden drei Waschschritten wurde der Durchfluss verworfen und der Filter in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend wurden 500 µl Inhibitor-Entfernungs-Puffer in das Pufferreservoir des Filters gegeben und die Probe bei 8000 x g für 60 s zentrifugiert. Nachdem der Durchfluss verworfen worden war,



## Material und Methoden

---

schlossen sich zwei Waschschr tte mit jeweils 500 µl Waschpuffer und eine Zentrifugation von 60 s bei 8000 x g an. Nach dem zweiten Waschschr tt wurde der Filter durch das Zentrifugieren bei 20.238 x g für 10 s getrocknet. Der Filter wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgef    überführt und 100 µl des erwärmten Elutionspuffers hinzugegeben. Nach der Zentrifugation für 60 s bei 8000 x g wurde der Filter verworfen und die DNA bei +2 bis +8  C gelagert. Eine Positivkontrolle aus 10 adulten Echinokokken, die von Fu/2002/324 stammte, und eine Negativ-Kontrolle, bestehend aus 25 µl Aqua bidest., wurden bei jeder DNA-Isolation als Prozesskontrolle mitgeführt.

### 4.2.3.2 Überprüfung der DNA-Quantität und -Reinheit

Zur Quantifizierung der DNA wurde ein Spektralphotometer (NanoPhotometer P330 mit dem Deckel Lid 10, virtuelle Verdünnung 1:10), IMPL N, München, Deutschland) genutzt. Aus der Messung der optischen Dichte (OD) der gelösten DNA bei 260 nm wurde auf der Grundlage der Lambert-Beer-Gleichung die DNA-Konzentration in der Lösung bestimmt:

$$E_{\lambda} = -\log_{10}\left(\frac{I}{I_0}\right) = \epsilon_{\lambda} \times c \times d$$

$E_{\lambda}$ : Extinktion

$\epsilon_{\lambda}$ : Extinktionskoeffizient

$I$ : Intensität des transmittierten Lichtes

$I_0$ : Intensität des einfallenden Lichtes

$c$ : Konzentration der absorbierten Substanz in der Flüssigkeit

$d$ : Weglänge des Lichtes im Material

Die Formel wurde vom Hersteller des Gerätes umgeformt zu:

$$c_{\text{nuc}} = \text{Abs. 260} \times \text{factor}_{\text{nuc}} \times \text{lid factor} \times \text{dilution factor}$$

$c_{\text{nuc}}$                       Konzentration der DNA (ng/Öl)

Abs. 260                    Absorption (AU) der DNA

$\text{factor}_{\text{nuc}}$                 substanzspezifischer Faktor (ng \* cm/Öl) (doppelsträngige DNA = 50)

lid factor                    virtueller Verdünnungsfaktor, bei Deckel 10 =  $\frac{1}{10}$

Für die Bestimmung der DNA-Reinheit wird das Verhältnis von  $\frac{OD_{260}}{OD_{280}}$  verwendet. Dabei gilt ein Verhältnis von 1,8 bis 2,0 als Beleg für das Vorliegen hinreichend reiner DNA.

Für die Kalibrierung des Spektralphotometers wurde der Elutionspuffer des High Pure PCR Template Preparation Kit von Roche® nach jeder Extraktion verwendet. Eine Extraktion umfasste 22 Proben, somit fand eine Kalibrierung des Spektralphotometers nach 22 Proben statt. Die DNA-Konzentration wurde unter Verwendung der Einstellung „background correction“ in 1 µl der Probe bestimmt.

### 4.2.3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerasekettenreaktion (PCR) werden bestimmte DNA-Abschnitte exponentiell vervielfältigt. Indem die drei Reaktionsschritte Denaturierung der DNA, Annealing der Primer und Elongation zyklisch wiederholt werden, wird das DNA-Fragment, das als Matrize dient, mit Hilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase zwischen zwei Primern, die gegenläufig an die DNA-Stränge binden, amplifiziert. Die Anzahl der Zyklen sowie die verwendeten Temperaturen und Dauer der Schritte sind abhängig von der Fragmentlänge und den verwendeten Primern. Die PCR wurde 1983 von Kary B. Mullis und Kollegen entwickelt (Mullis *et al.*, 1986).

Alle PCR-Ansätze wurden auf Eis in 0,2 ml-Reaktionsgefäße pipettiert und im Thermocycler unter Verwendung eines Vorwärts- und eines Rückwärtsprimers (Tabelle 2) zur Reaktion gebracht. Alle Reaktionen wurden in einem 25 µl Ansatz im Platinum® Taq DNA Polymerase Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Germany, Braunschweig, Deutschland) und den dNTPs (STRATEC Molecular GmbH, Berlin, Deutschland) mit folgenden Bestandteilen durchgeführt:

## Material und Methoden

---

X µl	DEPC-Wasser
2,5 µl	10 x Puffer
0,2 µl	dNTPs (12,5 mM)
1,5 µl	MgCl <sub>2</sub> (50 mM)
0,5 µl	Vorwärtsprimer (100 pmol/µl)
0,5 µl	Rückwärtsprimer (100 pmol/µl)
0,2 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)
Y µl	DNA

Die für die PCR nötigen Vorwärts- und Rückwärtsprimer wurden aus der Tabelle 2 ausgewählt.

Das verwendete DNA-Volumen wurde in Abhängigkeit der DNA-Konzentration eingesetzt und variierte von 1 µl bis zu 4 µl. Ziel war, 10 ng DNA pro Reaktionsansatz zu verwenden.

Die Reaktion fand unter folgenden Bedingungen im PCR Thermocycler FlexCycler (Analytik Jena AG, Jena, Deutschland) statt.

Initiale Denaturierung:	94 °C	5 min
-------------------------	-------	-------

40 Zyklen Amplifikation:

Denaturierung:	94 °C	1 min
Annealing:	55 °C	1 min
Elongation:	72 °C	1 min
Terminale Synthese:	72 °C	5 min

### 4.2.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Kontrolle der gewünschten Länge der PCR-Produkte und zur Auftrennung von DNA-Fragmenten mit unterschiedlicher Größe sowie zur Kontrolle der PCR-Reinigung wurde die Agarose-Gelelektrophorese genutzt. Dabei wandern die negativ geladenen DNA-

## Material und Methoden

---

Moleküle in einem elektrischen Feld zur Anode. Die Fragmentgröße sowie die Porengröße des Gels, die von der Agarosekonzentration abhängig ist, sind bei konstanter Spannung entscheidend für die Laufgeschwindigkeit der DNA.

Für die Gelelektrophorese wurden 1,5 %ige Agarosegele aus Agarose und 0,5X TBE-Puffer verwendet. Diese Gele wurden mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5 µg/ml) versetzt. In die Geltaschen wurden insgesamt 7 µl, bestehend aus 5 µl PCR-Probe versetzt mit 2 µl Ladepuffer (Orange G), sowie zur Größenzuordnung der Fragmente 4 µl Markerlösung, bestehend aus 2 µl Marker [100 bp] und 2 µl Ladepuffer, aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 120 V in 0,5X TBE-Puffer für 1 h 20 min. Das Ethidiumbromid interkaliert in die DNA. Unter dem UV-Licht werden dadurch die DNA-Fragmente als fluoreszierende Banden sichtbar. Die Auswertung und Dokumentation erfolgte im Geldokumentationsgerät GenoPlex (VWR, Darmstadt, Deutschland) und unter Verwendung der Auswertesoftware Geno Capture (VWR, Darmstadt, Deutschland).

### 4.2.3.5 PCR-Reinigung

Vor der Sequenzierung von PCR-Produkten müssen diese zunächst von Primern, Puffer- und Polymeraserückständen gereinigt werden.

War nach der Elektrophorese nur eine Bande des PCR-Produktes im Gel mit der gewünschten Fragmentgröße zu sehen, so wurde diese Probe mit dem QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland) aufgereinigt. Dazu wurden 100 µl Bindepuffer zum PCR-Produkt hinzugegeben und gemischt. Anschließend wurde die Suspension auf den QIAquick® Filter übertragen und für 60 s bei 17.900 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und 750 µl des Waschpuffers auf den Filter gegeben. Es folgte eine weitere Zentrifugation für 60 s bei 17.900 x g. Nach dem Verwerfen des Durchflusses wurde der Filter getrocknet, indem die Probe nochmals unter gleichen Bedingungen zentrifugiert wurde. Anschließend wurde der Filter in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 30 µl Elutionspuffer auf den Filter gegeben. Es folgte eine Inkubation für 60 Sekunden bei RT mit anschließender Zentrifugation unter den oben genannten Bedingungen. Der Filter wurde verworfen und die Probe bei +2 bis +8 °C gelagert.

### 4.2.3.6 Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Dabei werden während der Amplifikation eines DNA-Stranges an zufälligen Stellen des Fragmentes ddNTPs (Dideoxynucleotide) eingebaut. Dadurch kommt es zum Kettenabbruch. Indem die eingebauten fluoreszierenden ddNTPs schrittweise detektiert werden, wird nach Auftrennung der unterschiedlich langen Fragmente die DNA-Sequenz ermittelt.

Vor Beginn der Sequenzierung musste eine Sequenzierreaktion angesetzt werden, bei der der DNA-Strang mit den ddNTPs amplifiziert wurde. Dazu wurde das BigDye<sup>®</sup> Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems<sup>®</sup>, Braunschweig, Deutschland) verwendet. Der 10 µl Reaktionsansatz beinhaltete folgende Bestandteile und wurde auf Eis in ein 0,2 ml-Reaktionsgefäß pipettiert.

2,5 µl	DEPC-Wasser
2 µl	Big Dye <sup>®</sup>
1 µl	5X Big Dye Buffer
0,5 µl	Primer (100 pmol/µl)
4 µl	gereinigtes PCR-Produkt

Der Primer, welcher in der PCR zur Amplifikation des DNA-Fragments genutzt wurde, wurde auch für die Sequenzierreaktion verwendet. Im Sequenziermix sind die fluoreszenzmarkierten ddNTPs, dNTPs, eine Polymerase und ein Puffer enthalten. Die Sequenzierreaktion fand nach einer initialen Denaturierung von einer Minute bei 96 °C in 25 Zyklen unter folgenden Bedingungen im Thermocycler statt.

Denaturierung: 10 s bei 96 °C

Primer-Annealing: 5 s bei 50 °C

Elongation: 4 min bei 60 °C

Anschließend mussten die Proben gereinigt werden. Dazu wurde das SigmaSpin Post-Reaction Clean-Up Columns Reinigungs-Kit (Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, Deutschland) verwendet. Zu Beginn der Reinigung erfolgte die Entleerung der Reinigungssäulen durch einen Zentrifugationsschritt für 2 min bei 680 x g. Der Durchfluss wurde mit dem Auffanggefäß verworfen und die Säule in ein 1,5 ml

## Material und Methoden

---

Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend wurde der gesamte Sequenzierungsansatz (10 µl) auf die Säule überführt und für vier Minuten bei 680 x g zentrifugiert. Die Säule wurde verworfen und 10 µl Hi-Di™ Formamid zu dem aufgereinigten Sequenzierungsprodukt gegeben. Anschließend wurde die Probe im ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific Germany, Braunschweig, Deutschland) sequenziert.

Die Sequenzierung der meisten Proben erfolgte mit dem LIGHTRUN der Firma GATC Biotech AG (Köln, Deutschland) nach der Kettenabbruchmethode. Hierzu wurden 5 µl [5 pmol/µl] des jeweiligen Primers für die Sequenzierung in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt, 5 µl des aufgereinigten PCR-Produkts hinzugegeben und der Firma zugesandt. Das Unternehmen stellte die Ergebnisse der Sequenzierung über ein Internetportal zur Verfügung.

Alle Sequenzen wurden anschließend mit dem Programm Geneious® Version 10.2 (<http://www.geneious.com>, Biomatters, Auckland, Neuseeland (Kearse *et al.*, 2012)) bearbeitet und ausgewertet. Mit Hilfe des NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) Standard Nucleotide BLAST® Internet-Tools (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) wurden die ermittelten Sequenzen mit denen anderer Helminthen aus der NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) verglichen.

### 4.2.3.7 Mikrosatellitenbestimmung

Für die Mikrosatellitenbestimmung wurden die Produkte der PCR mit dem Vorwärts-Primer EmsBA und dem FAM-Farbstoff markierten Rückwärts-Primer verwendet. Das PCR-Produkt wurde an die Firma SMB (SMB Services in Molecular Biology GmbH, Berlin, Deutschland) gesendet, bei der eine Längenauftrennung mittels Kapillargelelektrophorese stattfand. Dazu wurde ein POP7 Polymer und der Marker Red 600, beide von der Firma NimaGen B.V., Nijmegen, Niederlande, und das Gerät ABI 3130 (Applied Biosystems® Thermo Fisher Scientific Germany, Braunschweig, Deutschland) verwendet. Mit Hilfe der GeneMapper® Software 5 (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) fand die Auswertung der Daten statt.

### 4.2.4 Statistische Auswertung

Mit Hilfe der Programme Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA), R (R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich, <https://www.R-project.org>) und SaTScan v9.3.1 (Kulldorff M. and Information Management Services, Inc. SaTScanTM v9.3.1: Software for the spatial and space-time scan statistics. <http://www.satscan.org/>, 2009.) wurden statistische Analysen der Daten durchgeführt.

Der Fisher's-Exakt-Test wurde in R mit der R-Routine „fisher.test“ zur Überprüfung der unterschieden zwischen den EmsB-Profilanteilen der Proben aus Brandenburg durchgeführt. Das Signifikanzniveau von 5% ( $p \leq 0,05$ ) wurde bei multiplem Testen nach Bonferroni korrigiert.

Für die Gruppierung der visuell ermittelten EmsB-Mikrosatelliten-Profile wurde zum einen die Methode des Kohonennetzes, auch als Kohonenkarten bezeichnet (Selforganizing Kohonen Network/ Selforganizing Kohonen Maps (SOM)) (Kohonen, 2001; Melssen *et al.*, 2006; Törönen *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2002) verwendet. Hierzu wurden die in dieser Arbeit ermittelten standardisierten numerischen EmsB-Profile als Datengrundlage (auch Input-Data oder x-Map genannt) eingesetzt. Dem Programm wurde vorgegeben, wie viele Gruppen erwartet wurden; dies sind in der Programmsyntax die Output-Data oder y-Map. Die Klassifikation wurde anschließend mit der xyf-Funktion des R-Pakets „kohonen“ vorgenommen. Die Topologie des Gitters war immer hexagonal und die Daten wurden 10.000-mal präsentiert.

Als zweite Methode für die Überprüfung der Profile wurde die Methode der Sammons nicht-linearen Kartierung mit k-mean-Clustering herangezogen. Diese Analysen wurden mit den standardisierten numerischen EmsB-Profilen der Proben aus Brandenburg und Nordrhein-Westfalen durchgeführt. Hierzu wurden die in dieser Arbeit ermittelten standardisierten numerischen EmsB-Profile als Datengrundlage verwendet und die Distanzen zueinander berechnet. Diese Berechnung erfolgte in R mit der Routine „dist“. Anhand der Distanzen wurde mittels der R-Routine „sammon“ die Sammon-Analyse und mit Hilfe „kmeans“ die k-means-Clusteranalyse durchgeführt (Karger *et al.*, 2012; Karger *et al.*, 2011). Die Analyse erfolgte unter der Annahme von drei Clustern.

### 4.2.5 Räumliche Darstellung und Auswertung der Daten

Zur Visualisierung der geografischen Daten wurde das Programm ArcGIS 10.2.2 (ESRI Environmental Systems Research Institute, Redlands, USA) verwendet.

Weiterhin wurde für die räumlichen Untersuchungen das Programm SaTScan (SaTScan.org, M. Kulldorff, Harvard Medical School and Harvard Pilgrim Health Institute, Boston, USA) verwendet. Die räumliche Analyse mittels der Suche nach Clustern mit hohen Raten wurde unter Verwendung eines Bernoulli-Modells durchgeführt (Jung *et al.*, 2010; Kulldorff, 1997). Bei der Analyse, die einen Abstandstest darstellt, wird mit den *E. multilocularis*-Parasiten eines Fuchses begonnen und die eines weiteren Fuchses, welcher in räumlicher Nähe zum ersten aufgefunden wurde, in Bezug auf die Ähnlichkeit der Ems-B Profile geprüft. Besaßen die beiden getesteten Füchse Wurmisolate mit demselben Ems-B Profil, wurden sie als potentielle Cluster zusammengefasst. Nach und nach wurden weitere Füchse mit steigendem Abstand hinzugefügt und der so erweiterte potentielle Cluster jeweils daraufhin geprüft, ob das Clustern von der erwarteten zufälligen Verteilung mit mindestens 95% Wahrscheinlichkeit abwich. Wurde die Wahrscheinlichkeitsschwelle nicht erreicht, war die Analyse für dieses Cluster beendet, und eine neue Prüfung begann mit den Wurmisolaten eines weiteren Fuchses in einem anderen geografischen Bereich des Studiengebiets. Die Analyse wurde mittels Monte Carlo-Simulation durchgeführt (999 Wiederholungen) (Jung *et al.*, 2010; Kulldorff, 1997).

Das Programm berechnet die geografischen Koordinaten des Mittelpunktes sowie den Radius des jeweils ermittelten Clusters. Diese Daten wurden kartographisch dargestellt

### 4.2.6 Phylogenetische Untersuchungen

Phylogenetische Untersuchungen wurden mit Hilfe der Programme Geneious, Mega Version 6 (Tamura K, Stecher G, Peterson D, FilipSKI A, and Kumar S (2013)) (MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30: 2725-2729., <http://www.megasoftware.net/>)) (Tamura *et al.*, 2013) und R durchgeführt.

Für die phylogenetische Analyse der Nukleotidsequenzen wurde das Hasegawa–Kishino–Yano (HKY)-Modell (Hasegawa *et al.*, 1985) unter Verwendung der diskreten Gamma-Verteilung (+G) und Zulassung von invarianten Positionen (+I) (Tamura *et al.*, 2011) verwendet. Zur Konstruktion der Phylogenie für AS-Sequenzen wurde die Maximum-Likelihood (ML)-Analyse unter Verwendung des Jones-Taylor-Thornton (JTT)-Modells mit dem Substitutionsmodell der diskreten Gamma-Verteilung (+G) genutzt (Tamura *et al.*, 2011; Yang, 1994).



### 5. Ergebnisse

Insgesamt wurden von 101 Füchsen fünf adulte *E. multilocularis*-Würmer pro Tier isoliert und von jedem einzelnen Parasiten DNA extrahiert. Dies entspricht einer Gesamtzahl von 505 Parasitenisolaten. Unter Verwendung der drei mitochondrialen Marker Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit 1 (cox1), NADH-Dehydrogenase Untereinheit 1 (nd1) und der ATP-Synthase Untereinheit 6 (atp6) und des Mikrosatelliten-Markers EmsB wurden diese Isolate hinsichtlich ihrer Genotypen untersucht. Für die Sequenzalignments wurde die Sequenz mit der Gen-Banknummer AB018440 (Nakao *et al.*, 2002) als Referenz verwendet.

#### 5.1 Sequenzierung

##### 5.1.1 Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit 1

Von den insgesamt 505 Proben konnten mittels PCR und anschließender Sequenzierung bei 472 Proben (93,5 %) die DNA-Sequenzen für die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit1 (cox1) bestimmt werden. Für 85 von 101 untersuchten Füchsen (84,2 %) wurden alle fünf Wurmisolate mittels cox1-Marker sequenziert. Im Sequenzalignment wurden vier verschiedene Einzelnukleotidunterschiede (single nucleotide polymorphisms, SNP) im Vergleich zu allen anderen Proben dieser Arbeit detektiert (Abbildung 3).

Ein SNP konnte in einer Wurmsequenz aus dem Fuchs Fu/2009/1607 sowie in allen fünf Wurmisolaten des Fuchses Fu/2011/1869 nachgewiesen werden. Der SNP befindet sich an der Base 9528 und ist ein Austausch von G zu T.

Ein Wurmisolat des Fuchses Fu/2011/420 wies einen anderen SNP an der Nukleotidposition 10146 auf. Dabei kam es zu einem Austausch von C zu T im Vergleich zur Referenzsequenz. Die weiteren vier Isolate unterschieden sich nicht hinsichtlich des cox1-Makers von den anderen Isolaten aus Brandenburg und Nordrhein-Westfalen.

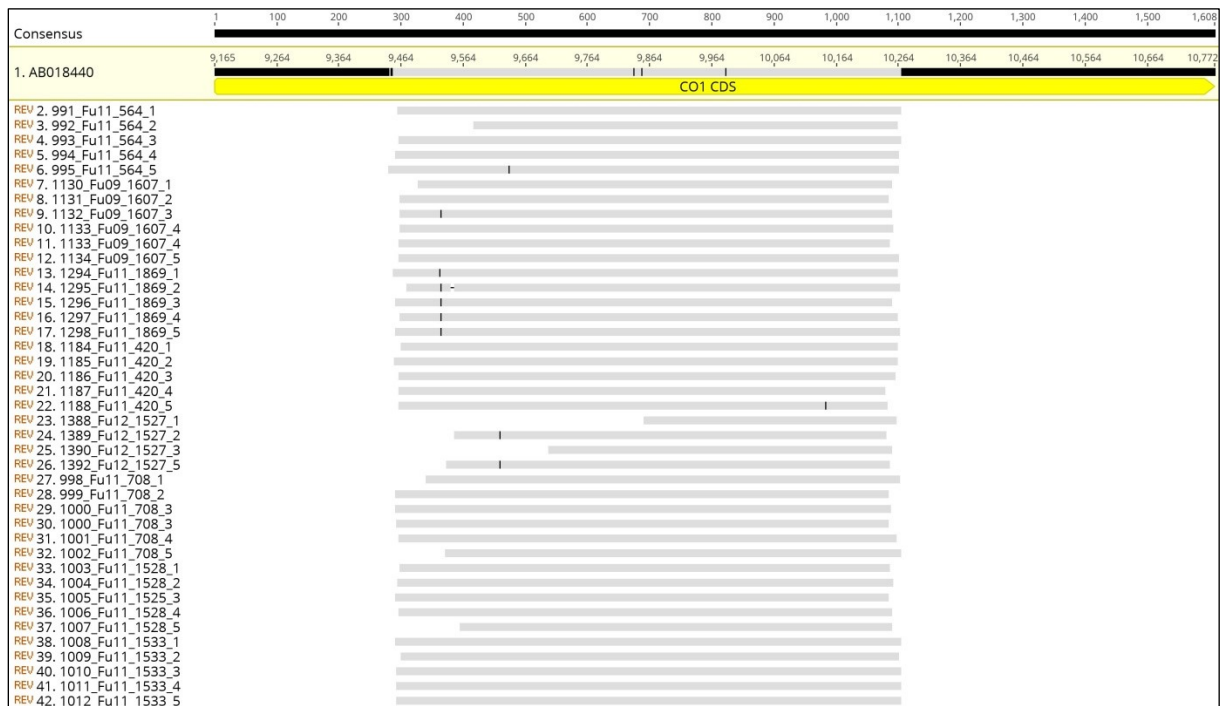
An der Nukleotidposition 9625 wurde ein weiterer SNP bei zwei Parasitenisolaten des Fuchses Fu/2012/1527 festgestellt. Es gab einen Austausch von C zu T im Vergleich zur Referenzsequenz AB018440. Allerdings ließen sich nicht alle fünf Wurmisolate des Fuchses sequenzieren. Außerdem war bei zwei Isolaten nicht die gesamte Zielsequenz von ca. 800 bp, sondern nur 700 bp bzw. 690 bp lesbar. Die Nukleotidsequenz, die in der

## Ergebnisse

Umgebung des SNP lag, konnte auch nach Wiederholung der Sequenzierung nicht zweifelsfrei bestimmt werden.

Von fünf *E. multilocularis*-Isolaten des Fuchses Fu/2011/564 wies ein Isolat einen SNP, einen Austausch von A zu G, an der Nukleotidposition 9638 auf.

Die Proben aus der Schweiz wiesen keinen Unterschied in den Sequenzen des *cox1*-Markers im Vergleich zu den Proben aus Brandenburg und Nordrhein-Westfalen auf.



**Abbildung 3: Ausschnitt aus dem Alignment der *cox1*-Nukleotidsequenzen der untersuchten Isolate aus Brandenburg und Nordrhein-Westfalen und der Referenzsequenz AB018440.** Dargestellt ist der gesamte Genabschnitt des *cox1*-Gens (gelber Balken). Die schwarzen Striche repräsentieren die Position der SNPs in den Sequenzen der Parasiten-Isolate im Vergleich zur Konsensussequenz aller in dieser Arbeit untersuchten Proben.

Drei der vier SNPs hatten einen Aminosäureaustausch zur Folge (Abbildung 4). Es erfolgte ein Austausch von Leucin zu Phenylalanin, Glycin zu Cystein bzw. Alanin zu Valin.

## Ergebnisse



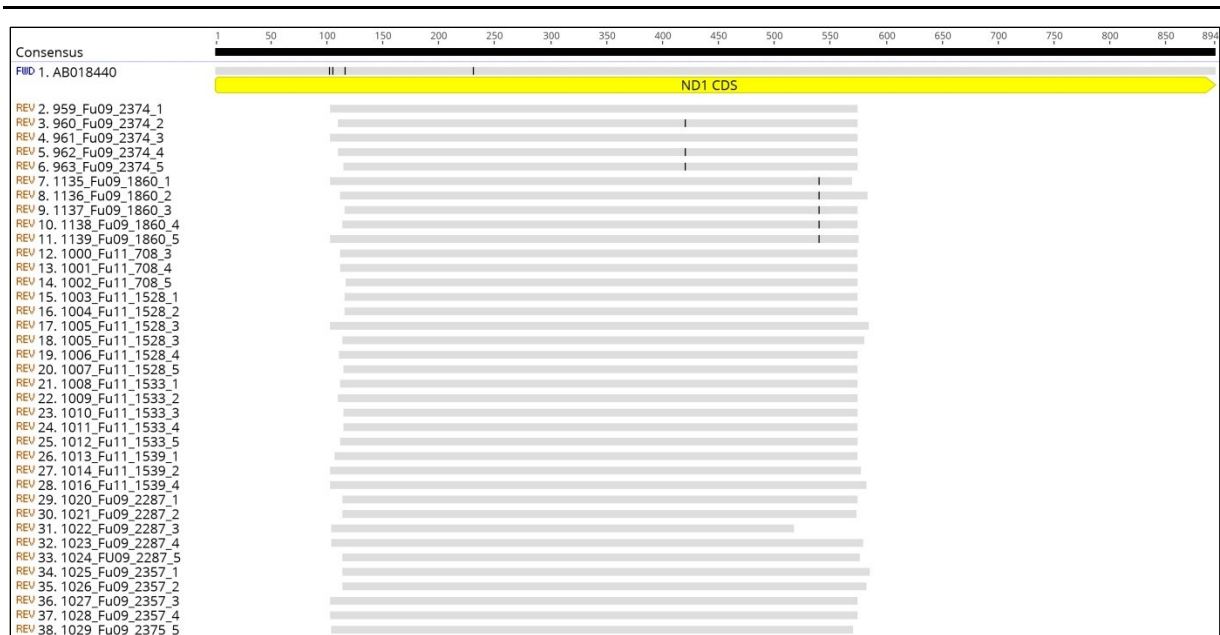
**Abbildung 4: Ausschnitt aus dem Alignment der cox1-AS-Sequenzen der untersuchten Isolate aus Brandenburg und Nordrhein-Westfalen und der Referenzsequenz AB018440.** Dargestellt ist die gesamte AS-Sequenz des cox1-Gens (gelber Balken). Die roten Striche repräsentieren die Position des AS-Austausches in den AS-Sequenzen der Parasiten-Isolate im Vergleich zur Konsensussequenz aller in dieser Arbeit untersuchten Proben. Die übereinstimmenden Bereiche in der AS-Sequenz sind grün dargestellt.

### 5.1.2 NADH-Dehydrogenase Untereinheit 1

Von insgesamt 505 Proben wurden mittels PCR und anschließender Sequenzierung in 470 Proben (93,1 %) DNA-Sequenzen für die NADH Dehydrogenase Untereinheit 1 (nd1) bestimmt. Bei 84 von 101 untersuchten Füchsen (83,2 %), wurde der nd1-Marker in allen fünf Wurmisolaten sequenziert.

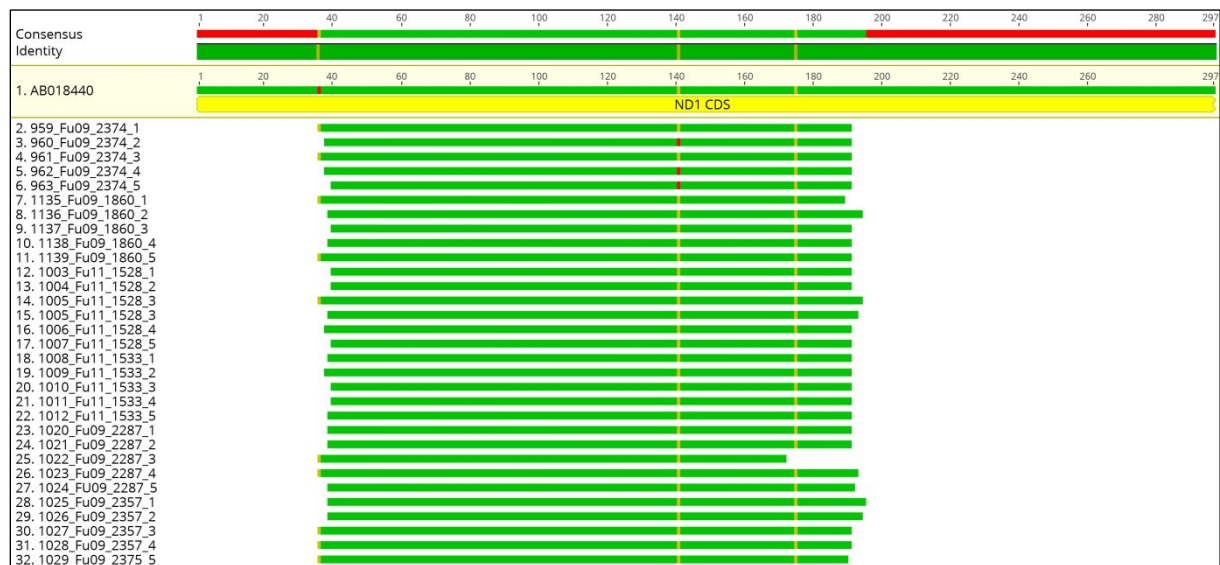
Im nd1-Gen wurden zwei verschiedene SNPs nachgewiesen (Abbildung 5). Drei der fünf Wurmisolate aus Fuchs Fu/2009/2374 zeigten einen SNP an Position 7911 bp im Vergleich zur Referenzsequenz AB018440. Dabei wurde ein G gegen ein A ausgetauscht. Alle fünf Parasitenisolate des Fuchses Fu/2009/1860 wiesen einen SNP an der Nukleotidposition 8030 auf. Dabei fand ein Austausch von einem A zu einem G im Vergleich zur Referenzsequenz statt.

## Ergebnisse



**Abbildung 5: Ausschnitt aus dem Alignment der nd1-Nukleotidsequenzen der untersuchten Isolate aus Brandenburg und Nordrhein-Westfalen und der Referenzsequenz AB018440.** Dargestellt ist der gesamte Genabschnitt des nd1-Gens (gelber Balken). Die schwarzen Striche repräsentieren die Position der SNPs in den Sequenzen der Parasiten-Isolate im Vergleich zur Konsenssequenz aller in dieser Arbeit untersuchten Proben.

Einer der beiden SNPs hatte einen Aminosäureaustausch zur Folge (Abbildung 6), dabei wurde Glycin zu Serin.



**Abbildung 6: Ausschnitt aus dem Alignment der nd1-AS-Sequenzen der untersuchten Isolate aus Brandenburg und Nordrhein-Westfalen und der Referenzsequenz AB018440.** Dargestellt ist die gesamte AS-Sequenz des nd1-Gens (gelber Balken). Die roten Striche repräsentieren die Position des AS-Austausches in den AS-Sequenzen der Parasiten-Isolate im Vergleich zur Konsenssequenz aller in dieser Arbeit untersuchten Proben. Die übereinstimmenden Bereiche in der AS-Sequenz sind grün dargestellt.

## Ergebnisse

---

Die Proben aus der Schweiz wiesen keinen Unterschied in den Sequenzen des nd1-Markers im Vergleich zu den Proben aus Brandenburg und Nordrhein-Westfalen auf.

### 5.1.3 ATP-Synthase Untereinheit 6

Von insgesamt 505 Proben wurden mittels PCR und anschließender Sequenzierung in 479 Proben (94,9 %) DNA-Sequenzen für die ATP-Synthase Untereinheit 6 (atp6) bestimmt. Bei 88 Füchsen von insgesamt 101 untersuchten Tieren (87,1 %) konnten alle fünf Wurmisolate mittels atp6-Marker sequenziert werden.

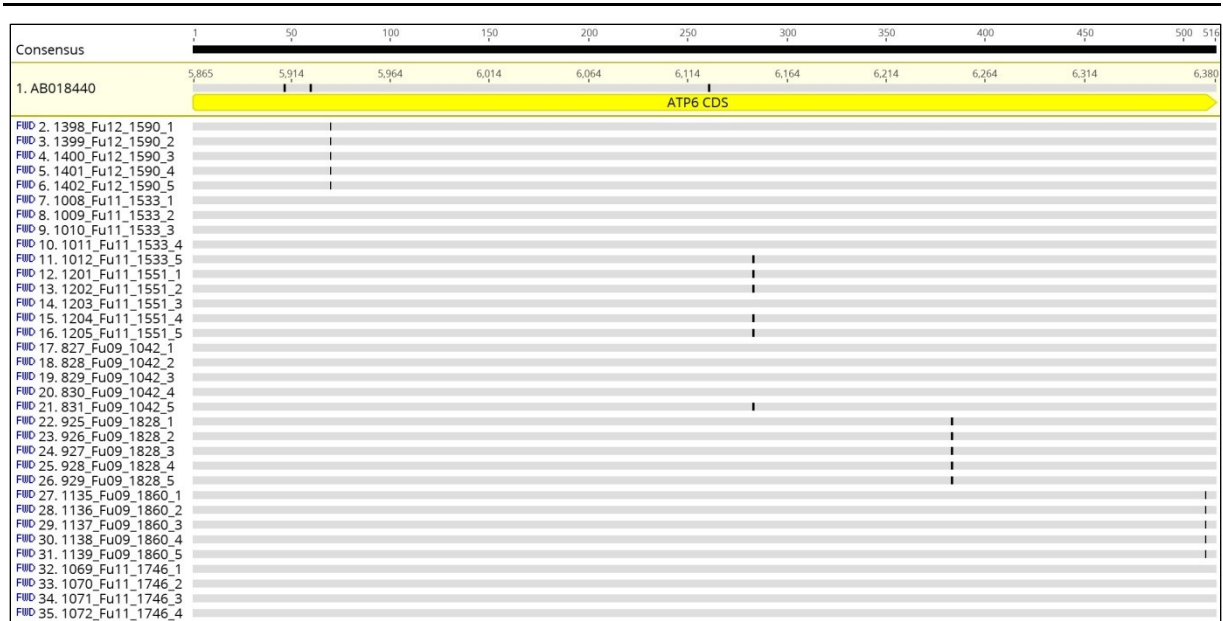
Im Sequenzalignment des atp6-Gens konnten vier verschiedene SNPs detektiert werden (Abbildung 7). Bei drei Füchsen (Fu/2011/1533, Fu/2011/1551 und Fu/2009/1042) wurde ein SNP an derselben Nukleotidposition in der atp6-Gensequenz in mindestens einer der fünf Wurmsequenzen nachgewiesen. Dabei kam es zu einem Austausch von C zu T an der Position 6147 bp im Vergleich zur Referenzsequenz AB18440. Vier von fünf Parasitensequenzen von Fuchs Fu/2011/1551 wiesen eine Veränderung an der Nukleotidposition des SNPs auf. Bei den Füchsen Fu/2011/1533 und Fu/2009/1042 war jeweils nur bei einer der fünf Sequenzen dieser SNP nachweisbar.

In allen fünf Wurmsequenzen des Fuchses Fu/2012/1590 konnte ein SNP von T zu C an der Nukleotidposition 5934 nachgewiesen werden, der bei keinem Parasiten eines anderen Fuchses gefunden wurde.

An der Nukleotidposition 6247 bp unterschieden sich alle fünf Parasitensequenzen des Fuchses Fu/2009/1828 von der Referenzsequenz AB018440 und von allen anderen Sequenzen durch einen Austausch von C zu T.

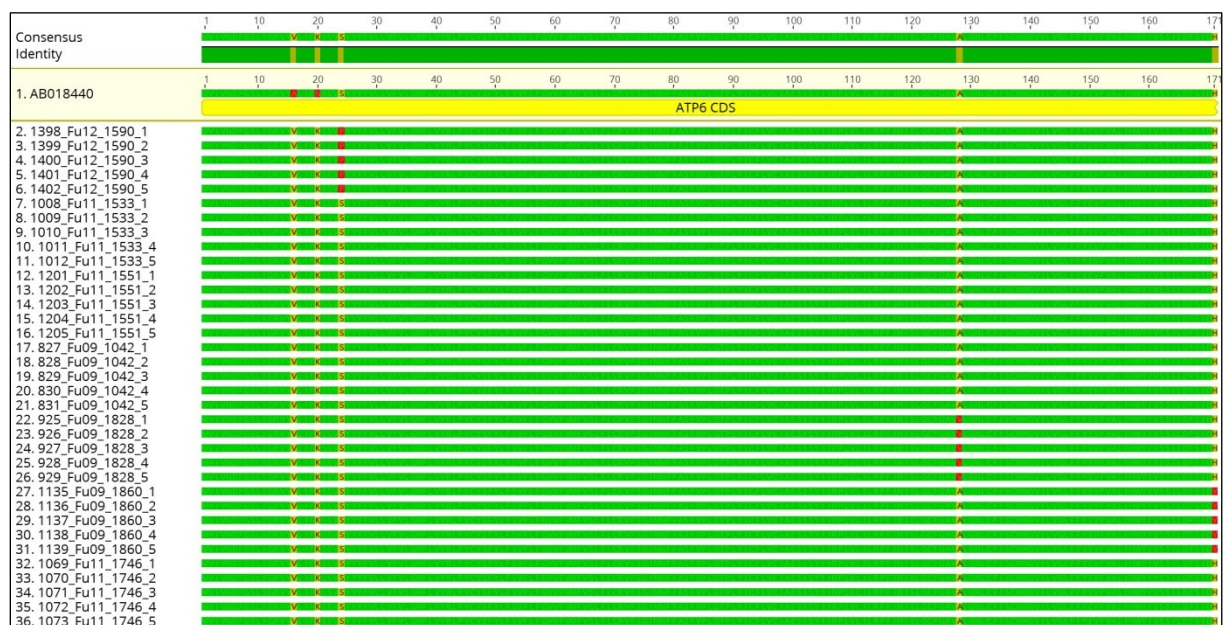
Die Sequenzen aller fünf Wurmisolate des Fuchses Fu/2009/1860 wiesen einen SNP an der Nukleotidposition 6375 und damit einen Austausch von C zu T auf.

## Ergebnisse



**Abbildung 7: Ausschnitt aus dem atp6-Nukleotidalignment der Isolate aus Brandenburg und Nordrhein-Westfalen und der Referenzsequenz AB018440.** Dargestellt ist der gesamte Genabschnitt des atp6-Gens (gelber Balken). Die schwarzen Striche repräsentieren die Position der SNPs in den Sequenzen der Parasiten-Isolate im Vergleich zur Konsenssequenz aller in dieser Arbeit untersuchten Proben.

Drei der vier SNPs hatten einen Aminosäureaustausch zur Folge (Abbildung 8). Zum einen kam es zu einem Austausch von Alanin zu Valin und zum anderen von Serin zu Prolin und weiterhin von Histidin zu Tyrosin. Die zuletzt genannte Aminosäure liegt am carboxy-terminalen Ende der Aminosäuresequenz des atp6-Markers.



**Abbildung 8: Ausschnitt aus dem Alignment der atp6-AS-Sequenzen der untersuchten Isolate aus Brandenburg und Nordrhein-Westfalen und der Referenzsequenz AB018440.** Dargestellt ist die gesamte AS-Sequenz des atp6-Gens (gelber Balken). Die roten Striche repräsentieren die Position des AS-Austausches in den AS-Sequenzen der Parasiten-Isolate im Vergleich zur Konsenssequenz aller in dieser Arbeit untersuchten Proben. Die übereinstimmenden Bereiche in der AS-Sequenz sind grün dargestellt.

## Ergebnisse

---

Die Proben aus der Schweiz wiesen keinen Unterschied in den Sequenzen des atp6-Markers im Vergleich zu den Proben aus Brandenburg und Nordrhein-Westfalen auf.

Insgesamt konnten bei 81 von 101 Füchsen (80,2 %) alle drei Marker bei allen fünf Wurmisolaten von jedem einzelnen Fuchs sequenziert werden. Mit Hilfe des cox1-Markers wurden bei vier Füchsen Mischinfektionen sowie mittels nd1-Marker bei einem weiteren Fuchs eine Mischinfektion nachgewiesen. Drei Füchse zeigten multiple Infektionen mit *E. multilocularis*-Genotypen, die sich hinsichtlich des atp6-Markers unterschieden.

### 5.2 EmsB-Mikrosatellitenanalyse

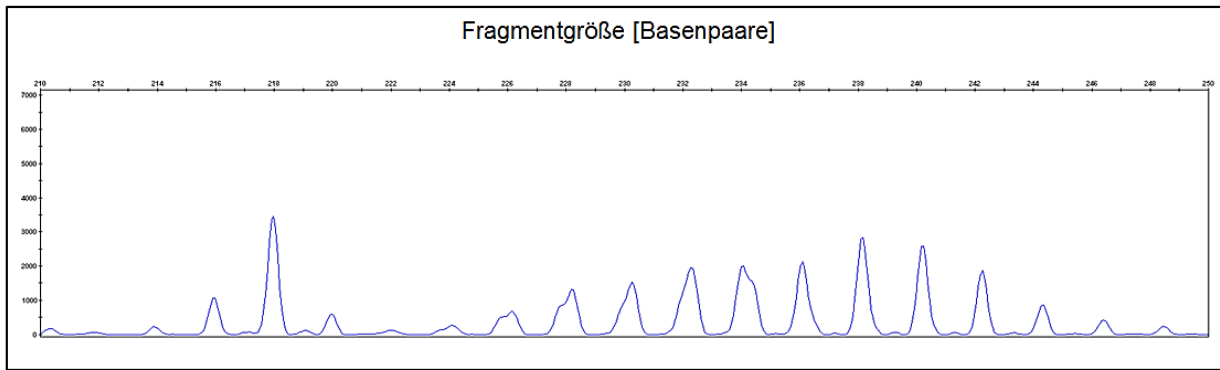
#### 5.2.1 Visuelle Auswertung

Von insgesamt 505 Proben wurden mittels PCR und anschließender Kapillargelelektrophorese in 490 Proben (97,0 %) die EmsB-Mikrosatellitenprofile bestimmt. Insgesamt konnte bei 91 von 101 untersuchten Füchsen (90,1 %) für alle fünf Wurmisolate ein EmsB-Profil identifiziert werden. Bei 80 von 101 Füchsen (79,2 %) wurden für jeden der vier Marker bei allen fünf Wurmisolaten Sequenzen bzw. EmsB-Profile bestimmt. Die Auswertung erfolgte manuell über eine visuelle Beurteilung und Charakterisierung der Profile im Vergleich zu publizierten Daten (Knapp *et al.*, 2007).

Profil D (Abbildung 9) wird charakterisiert durch die Abfolge von drei Peaks bei einer Fragmentlänge von 216, 218 und 220 bp. Dabei weist das Fragment bei 218 bp den höchsten Fluoreszenzwert auf. Dies bedeutet, dass dieses Fragment am häufigsten amplifiziert wurde, da die Signalstärke mit der Menge amplifizierter Fragmente korreliert. Weiterhin ist die Anzahl von 11 Peaks in dem Bereich von 226 bis 246 bp, bei dem ein Anstieg der Signalstärke bis zum Fragment der Basenlänge 238, gefolgt von einem Abfall der Signalstärke im Vergleich zu den vorhergehenden Peaks zu verzeichnen ist, charakteristisch für dieses Profil.

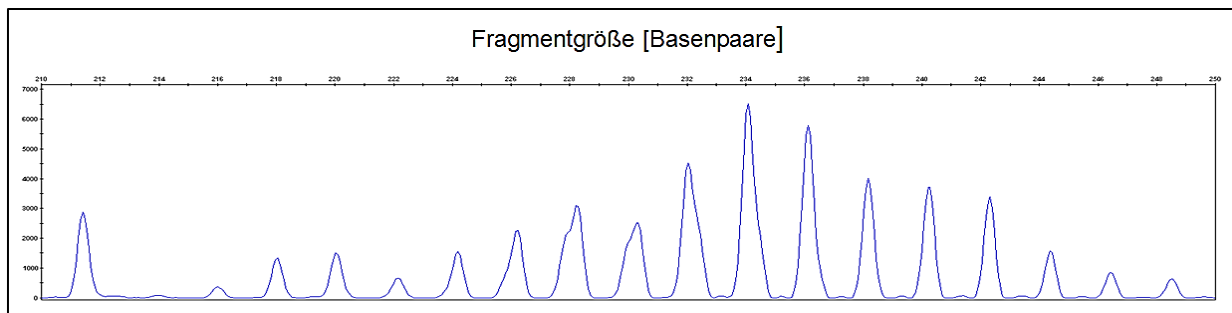


## Ergebnisse



**Abbildung 9: Elektropherogramm des EmsB-Mikrosatellitenprofils D.** Die Fluoreszenzstärke korreliert mit der Anzahl an amplifizierten Fragmenten. Das Profil D ist durch 14 Peaks charakterisiert. Kennzeichnend sind drei Peaks bei Fragmentlängen von 216, 218 und 220 bp. Dabei weist der mittlere Peak den höchsten Fluoreszenzsignalwert auf. Es folgen weitere sieben Peaks mit einem kontinuierlichen Anstieg in der Signalstärke bei Fragmentlängen von 226 bis 238 bp. Dem schließen sich vier weitere Peaks im Bereich 240 bis 246 bp an, bei denen mit Zunahme der Fragmentlänge das Fluoreszenzsignal abnimmt. Aufgetragen sind relative Fluoreszenzintensität (y-Achse) gegen Fragmentgröße (x-Achse).

Das Profil G (Abbildung 10) wird durch einen kontinuierlichen Anstieg in der Signalstärke der Peaks der Fragmente mit einer Basenlänge von 216, 218 und 220 gekennzeichnet. Weiterhin ist eine Anzahl von 13 Peaks zwischen 222 und 246 bp charakteristisch. Dabei ist ein Anstieg in den Signalstärken bis zum Fragment von 234 bp zu verzeichnen.

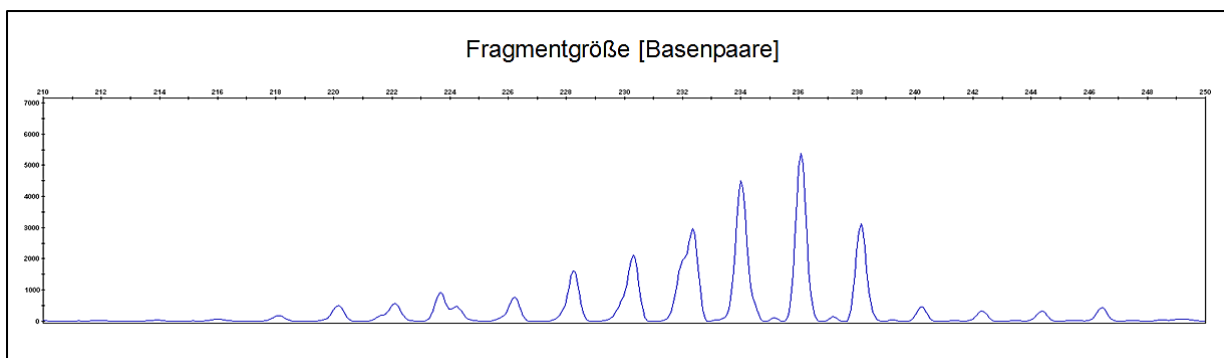


**Abbildung 10: Elektropherogramm des EmsB-Mikrosatellitenprofils G.** Die Fluoreszenzstärke korreliert mit der Anzahl an amplifizierten Fragmenten. Das Profil G wird durch insgesamt 16 Peaks gekennzeichnet. Typisch ist ein kontinuierlicher Anstieg des Fluoreszenzsignals von drei Peaks mit Fragmentlängen von 216, 218 und 220 bp. Weiterhin charakteristisch ist, dass die Fluoreszenz bei dem folgenden Peak bei 222 bp niedriger ist als bei dem Peak bei 220 bp. Von 222 bis 234 bp steigt die Höhe der insgesamt 7 Peaks kontinuierlich an. Im Bereich von 236 bis 246 nimmt die Signalstärke der folgenden 6 Peaks kontinuierlich ab. Aufgetragen sind relative Fluoreszenzintensität (y-Achse) gegen Fragmentgröße (x-Achse).

Das Profil H (Abbildung 11) ist durch eine Anzahl von sieben Peaks im Bereich von 226 bis 238 bp gekennzeichnet. Ein weiteres markantes Merkmal ist der abrupte Abfall der Signalstärke bei 238 bp.

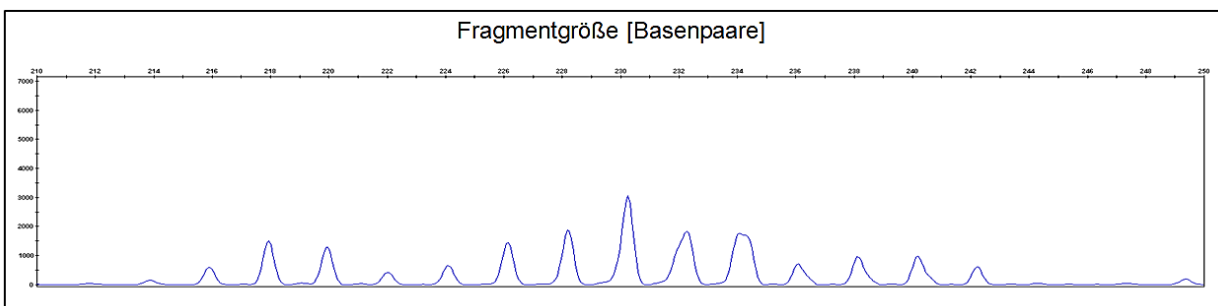


## Ergebnisse



**Abbildung 11: Elektropherogramm des EmsB-Mikrosatellitenprofils H.** Die Fluoreszenzstärke korreliert mit der Anzahl an amplifizierten Fragmenten. Das Profil H wird durch insgesamt 7 Peaks im Bereich von 226 bis 238 bp charakterisiert. Dabei nimmt die Signalstärke der 6 Peaks im Bereich 226 bis 236 kontinuierlich zu. Der Fluoreszenzwert des Peaks des 238 bp-Fragments ist dagegen deutlich niedriger als der des vorhergehenden Peaks. Aufgetragen sind relative Fluoreszenzintensität (y-Achse) gegen Fragmentgröße (x-Achse).

Das Profil E (Abbildung 12) ist dem Profil G ähnlich. Es beginnt ebenfalls mit drei in der Fluoreszenzintensität ansteigenden Peaks zwischen 216 und 220 bp. Anschließend sind jedoch 11 statt 13 Peaks im Bereich von 222 bis 242 bp zu finden. Ein weiterer Unterschied zum Profil G ist, dass der höchste Peak bei 230 bp liegt.



**Abbildung 12: Elektropherogramm des EmsB-Mikrosatellitenprofils E.** Die Fluoreszenzstärke korreliert mit der Anzahl an amplifizierten Fragmenten. Das Profil E wird durch insgesamt 14 Peaks gekennzeichnet. Typisch ist ein kontinuierlicher Anstieg des Fluoreszenzsignals von drei Peaks mit Fragmentlängen von 216, 218 und 220 bp. Weiterhin charakteristisch ist, dass die Fluoreszenz bei dem folgenden Peak bei 222 bp niedriger ausfällt als bei dem Peak bei 220 bp. Von 222 bis 230 bp steigt die Höhe der insgesamt 5 Peaks ebenfalls an. Im Bereich von 232 bis 236 bp nimmt die Signalstärke der 3 Peaks kontinuierlich ab. Im Bereich von 238 bis 242 bp alternieren die Spitzenwerte der 3 Peaks oder haben ähnlich Werte. Aufgetragen sind relative Fluoreszenzintensität (y-Achse) gegen Fragmentgröße (x-Achse).

Insgesamt konnte das Profil D bei 194 (38,4 %), das Profil G bei 257 (50,9 %), das Profil H bei 38 (7,5 %) und das Profil E bei 1 (0,2 %) von 505 Wurmisolaten visuell ermittelt werden.

Mittels Fisher's-Exakt-Test wurde geprüft, ob sich die Profilateile der Proben aus Brandenburg signifikant voneinander unterscheiden.

## Ergebnisse

**Tabelle 9: Fisher's-Exakt-Test zur Überprüfung der Unterschiede zwischen den Profilanteilen. Das Signifikanzniveau von 5% ( $p \leq 0,05$ ) wurde auf Grund multiplen Testens nach Bonferroni korrigiert. Somit ist der zu beachtende p-Wert zur Ablehnung der Nullhypothese (es besteht kein Unterschied zwischen den Profilanteilen)  $p \leq 0,0041\bar{6}$ .**

<b>Profil</b>	<b>Profil G</b>	<b>Profil D</b>	<b>Profil H</b>	<b>Profil E</b>
<b>Profil G</b>		$6,927 \times 10^{-5}$	$2,2 \times 10^{-16}$	$2,2 \times 10^{-16}$
<b>Profil D</b>	$6,927 \times 10^{-5}$		$2,2 \times 10^{-16}$	$2,2 \times 10^{-16}$
<b>Profil H</b>	$2,2 \times 10^{-16}$	$2,2 \times 10^{-16}$		$7,165 \times 10^{-11}$
<b>Profil E</b>	$2,2 \times 10^{-16}$	$2,2 \times 10^{-16}$	$7,165 \times 10^{-11}$	

Alle Profilanteile der Proben aus Brandenburg unterschieden sich statistisch signifikant voneinander ( $p \leq 0,0041\bar{6}$ ).

Bei 14 Füchsen (10 Füchse aus Brandenburg und 4 aus Nordrhein-Westfalen) unterschied sich mindestens ein EmsB-Profil von den anderen ermittelten Profilen der Wurmisolate dieses Fuchses.

Für 15 (3,0 %) Wurmisolate konnten auf Grund von zu geringer Fluoreszenzstärken und nicht eindeutiger Peaks die Profile nicht visuell bestimmt werden.

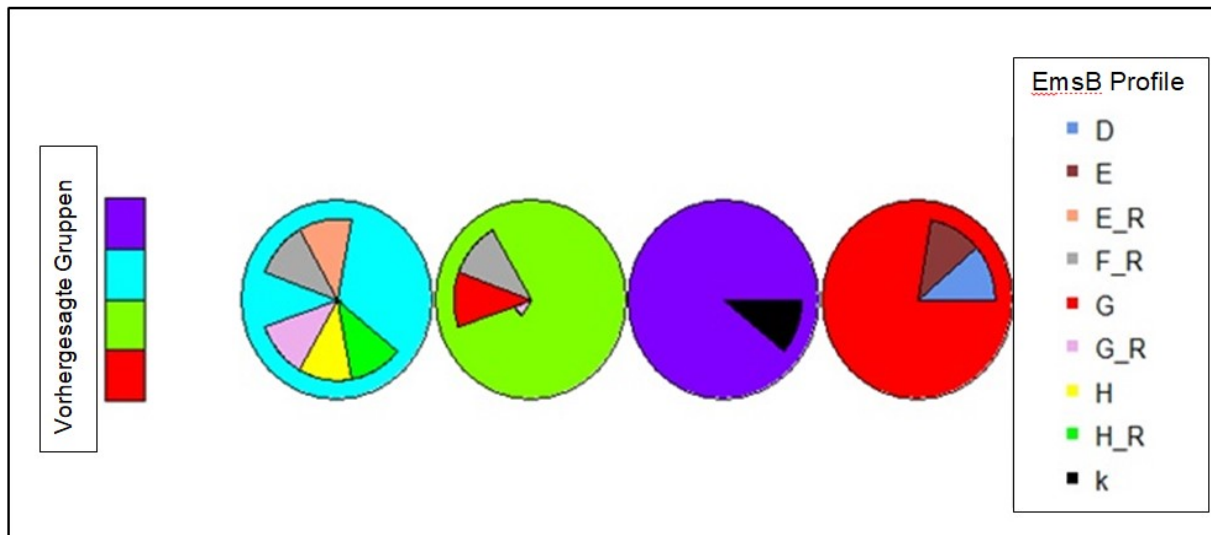
Für die Füchse Fu/2011/564, Fu/2009/1607, Fu/2011/420 und Fu/2012/1527, bei denen sich ein Wurmisolat von den anderen vier Wurmisolaten des gleichen Fuchses durch einen SNP im cox1-Gen unterschied, zeigte sich, dass sich dieses Wurmisolat auch im EmsB-Profil von den anderen vier Wurmisolaten des jeweiligen Fuchses unterschied. So wiesen alle vier Parasitenisolate des Fuchses Fu/2011/564 das Profil H auf und das Isolat Fu/2011/564-5 das Profil D. Bei Fuchs Fu/2009/1607 fand sich vier Mal das Profil G und einmal (im Wurmisolat 3) das Profil H. Der SNP im cox1-Gen des Wurmisolates 3 wurde auch in allen fünf Parasitenisolaten des Fuchses Fu/2011/1869 nachgewiesen. Alle Isolate von diesem Fuchs gehörten zum EmsB-Profil H. Bei Fuchs Fu/2011/420 wurde bei vier Isolaten das Profil D und bei einem Isolat das Profil H gefunden. Beim Fuchs Fu/2012/1527 wurde vier Mal das Profil D und einmal das Profil G nachgewiesen. Obwohl die EmsB-Profile Unterschiede aufwiesen, waren die beiden mitochondrialen Marker nd1 und atp6 gleich.

### 5.2.2 Gruppierung der Mikrosatelliten-Profile mittels Kohonennetz

Für die Analyse der Gruppierung der visuell ermittelten Profile und ihrer Unterscheidbarkeit (Differenzierungsvermögen) wurde die Methode des Kohonennetzes oder auch Kohonenkarten verwendet (Selforganizing Kohonen Network/ Selforganizing Kohonen Maps (SOM) (Melssen *et al.*, 2006; Törönen *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2002)). Hierzu wurden die in dieser Arbeit ermittelten standardisierten numerischen EmsB-Profile als Datengrundlage verwendet. Da wegen eines Wechsels des Standards für die Kapillargelelektrophorese eine Verzerrung in der Datenanalyse aufgetreten war, mussten 38 Proben aus dem Datensatz entfernt werden, so dass insgesamt 427 Proben für die Analyse mittels Kohonennetz zur Verfügung standen. Dem Programm wurde vorgegeben, wie viele Gruppen erwartet werden. Die Klassifikation wurde anschließend mit der xyf-Funktion (R-package „kohonen“) vorgenommen.

In der graphischen Visualisierung der Ergebnisse stellen Kreise die Gruppen der Profile dar. Kreise mit der gleichen Farbe gehören zur gleichen Gruppe. Die visuell ermittelten Profile sind in verschiedenfarbigen Kreissektoren dargestellt und wurden mittels xyf-Funktion den Gruppen zugeordnet.

Zu Beginn wurde die Existenz von vier Gruppen angenommen. Für die Analyse wurden alle visuell ermittelten Profile, einschließlich der Profile (k), die nicht zugeordnet werden konnten, sowie die Referenzprofile (Profilname mit dem Anhang \_R gekennzeichnet) verwendet (Abbildung 13).

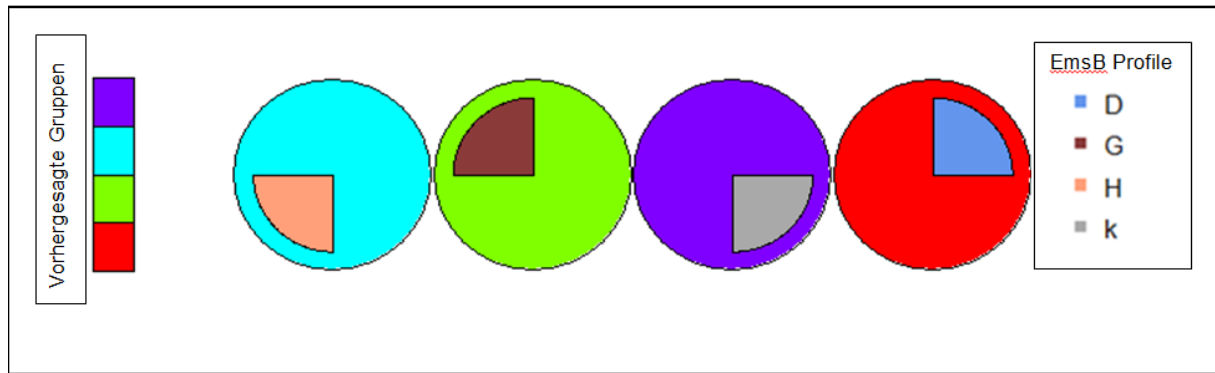


**Abbildung 13: Kohonennetzwerk-Analyse mit der Annahme von vier Gruppen unter Verwendung der EmsB-Profil-Daten der in dieser Arbeit untersuchten Proben und der Referenzproben aus der Schweiz.** Dargestellt sind die Ergebnisse der Gruppierung der EmsB-Profile. Die vier vorhergesagten Gruppen werden durch die vier Farben Rot, Grün, Lila und Hellblau repräsentiert. Die EmsB-Profile der Proben aus der vorliegenden Arbeit sind durch die Farben Blau für das Profil D (D), Braun für das Profil E (E), Rot für Proben mit dem Profil G (G) und Gelb für das Profil H (H) der Kreissektoren dargestellt. Isolate, denen kein EmsB-Profil zugeordnet werden konnte, sind durch den schwarzen Kreissektor (k) repräsentiert. Die EmsB-Profile der Referenzproben tragen zusätzlich zu der Bezeichnung des Profils den Buchstaben R. Die Referenzproben werden durch Kreissektoren in den folgenden Farben dargestellt: Hellrosa präsentiert das Profil E (E\_R), Grau das Profil F (F\_R), Altrosa das Profil G (G\_R) und Grün das Profil H (H\_R).

Die Analyse ergab vier Gruppen, die durch vier verschiedene Farben gekennzeichnet sind. Die Profile D und E wurden zu einer Gruppe zusammengefasst. Es ist zu beachten, dass nur eine von 490 Proben, bei denen ein EmsB-Profil ermittelt werden konnte, dem Profil E zugeordnet wurde. Proben, die visuell dem Profil H zugeordnet wurden, clusterten mit den Referenzprofilen H sowie mit den Referenzprofilen für E, G und F in einer Gruppe. Das Profil G clusterte gemeinsam mit dem Referenzprofil F und einem geringen Teil des Referenzprofils G. Die Proben, die keinem Profil eindeutig zugeordnet werden konnten, sind einer separaten Gruppe zusammengefasst.

Zum Vergleich wurde eine Analyse unter der Erwartung von vier Gruppen nur mit den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Proben aus Brandenburg und Nordrhein-Westfalen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 14 dargestellt.

## Ergebnisse



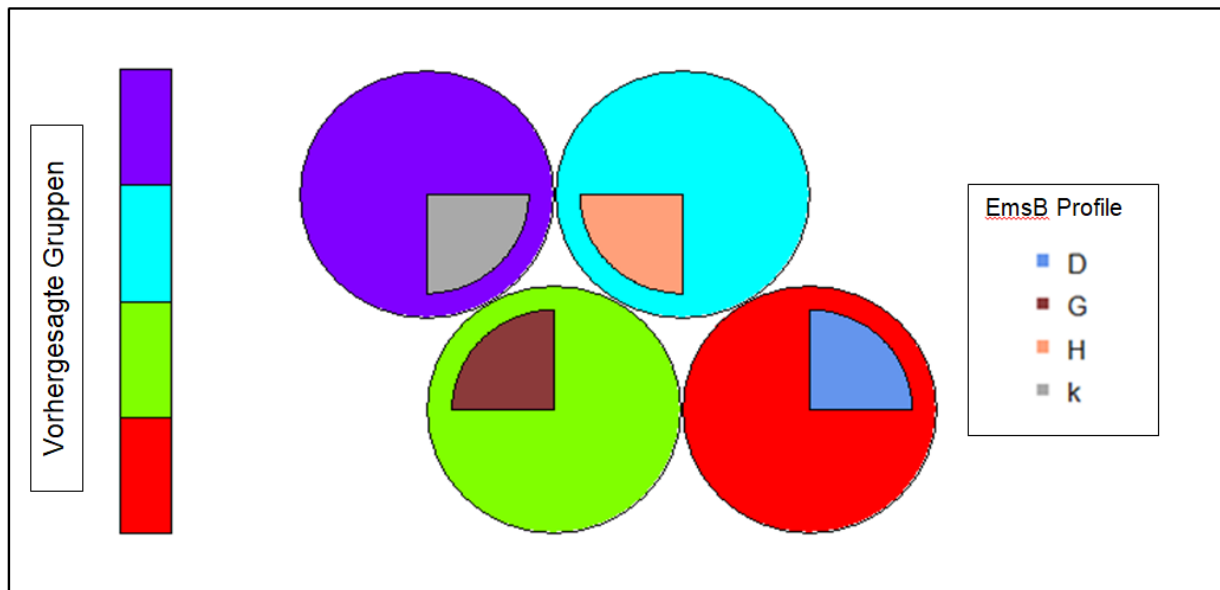
**Abbildung 14: Kohonen-Netzwerk-Analyse mit der Annahme von vier Gruppen unter Verwendung der EmsB-Profil-Daten der in dieser Arbeit untersuchten Proben ohne die Referenzproben aus der Schweiz.** Dargestellt sind die Ergebnisse der Gruppierung der EmsB-Profile. Die vier vorhergesagten Gruppen werden durch die vier Farben Rot, Grün, Lila und Hellblau repräsentiert. Die EmsB-Profile der Proben aus der vorliegenden Arbeit sind durch die Farben Blau für das Profil D (D), Braun für das Profil G (G) und Hellrosa für Proben mit dem Profil H (H) der Kreissektoren dargestellt. Isolate, denen kein EmsB-Profil zugeordnet werden konnte, sind durch den grauen Kreissektor (k) repräsentiert.

Dabei kam jedem Profil eine eigene Gruppe zu. Die Proben, die visuell keinem Profil zugeordnet werden konnten, bildeten in dieser Analyse ebenfalls eine separate Gruppe.

Zur Überprüfung der Ergebnisse wurde mit den Proben aus Brandenburg und Nordrhein-Westfalen eine weitere Analyse durchgeführt, bei der 2x2 Gruppen angenommen wurden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 dargestellt.

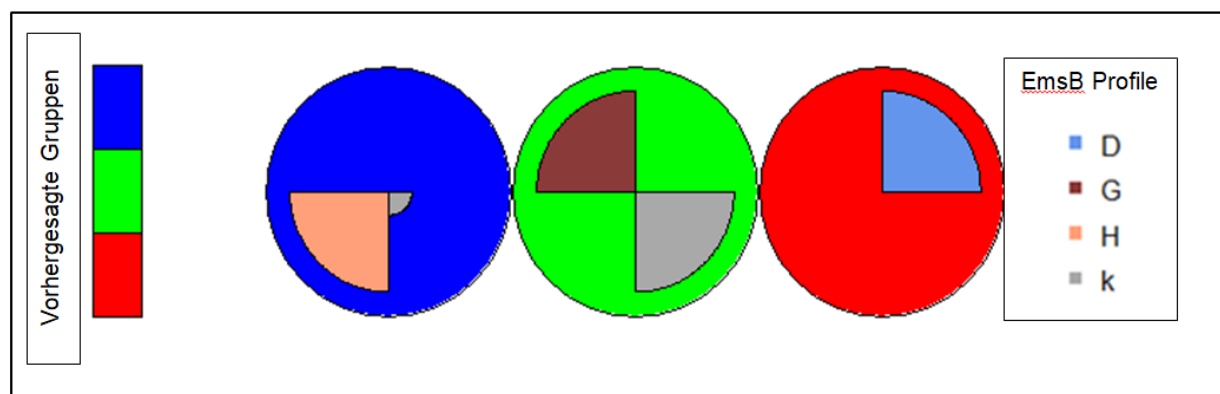
Diese Analyse ergab ebenfalls vier Gruppen, denen jeweils nur Proben mit einem Profil zugeordnet waren. Auch die Proben, die visuell keinem Profil zugeordnet werden konnten, clusterten in einer separaten Gruppe.

## Ergebnisse



**Abbildung 15: Kohonen-Netzwerk-Analyse mit der Annahme von 2x2 Gruppen unter Verwendung der EmsB-Profil-Daten der in dieser Arbeit untersuchten Proben.** Dargestellt sind die Ergebnisse der Gruppierung der EmsB-Profile. Die vier vorhergesagten Gruppen werden durch die vier Farben Rot, Grün, Lila und Hellblau repräsentiert. Die EmsB-Profile der Proben aus der vorliegenden Arbeit sind durch die Farben Blau für das Profil D (D), Braun für das Profil G (G) und Hellrosa für Proben mit dem Profil H (H) der Kreissektoren dargestellt. Isolate, denen kein EmsB-Profil zugeordnet werden konnte, sind durch den grauen Kreissektor (k) repräsentiert.

Um zu überprüfen, ob die visuell nicht auswertbaren Profile nicht doch noch den anderen Profilen zugeordnet werden konnten, wurde eine weitere Analyse unter der Annahme der Existenz von drei Gruppen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 16 dargestellt.



**Abbildung 16: Kohonen-Netzwerk-Analyse mit der Annahme von 3 Gruppen unter Verwendung der EmsB-Profil-Daten der in dieser Arbeit untersuchten Proben.** Dargestellt sind die Ergebnisse der Gruppierung der EmsB-Profile. Die drei vorhergesagten Gruppen werden durch die vier Farben Rot, Grün und Blau repräsentiert. Die EmsB-Profile der Proben aus der vorliegenden Arbeit sind durch die Farben Blau für das Profil D (D), Braun für das Profil G (G) und Hellrosa für Proben mit dem Profil H (H) der Kreissektoren dargestellt. Isolate, denen kein EmsB-Profil zugeordnet werden konnte, sind durch den grauen Kreissektor (k) repräsentiert.

## Ergebnisse

---

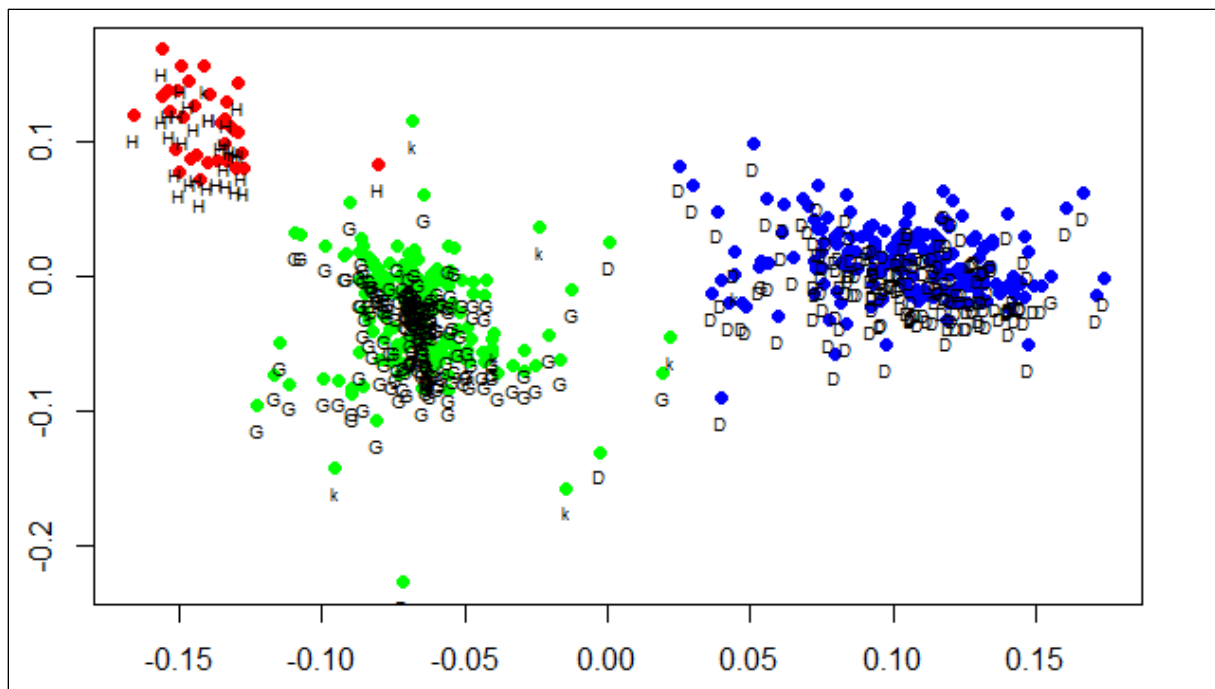
Unter der Annahme der Existenz von drei Gruppen bildeten die visuell ermittelten Profile G und die Proben, die keinem Profil eindeutig zugeordnet werden konnten, eine Gruppe. Des Weiteren clusterte ein geringer Teil der Proben, die nicht zugeordnet werden konnten, mit dem Profil H. Dem Profil D wurden keine Proben ohne visuell auswertbares Profil zugeordnet.

Mit Hilfe dieser Methode konnte gezeigt werden, dass sich die visuell ermittelten Profile D, G und H voneinander unterscheiden.

### **5.2.3 Gruppierung der Mikrosatelliten-Profile mittels Sammons nicht-linearer Kartierung mit k-mean-clustering**

Als zweite Methode für die Überprüfung des Differenzierungsvermögens zwischen den Profilen wurde die Methode der Sammons nicht-linearen Kartierung mit k-mean-Clustering herangezogen. Diese Analysen wurden mit den standardisierten numerischen EmsB-Profilen der Proben aus Brandenburg und Nordrhein-Westfalen durchgeführt. In der Abbildung 17 stellen die Farben der Punkte die Ergebnisse der Analyseverfahren „k-means clustering“ unter der Annahme der Existenz von drei Clustern dar. Die Position der Punkte im Koordinatensystem bildet die Ergebnisse der „Sammon's non-linear Mapping“-Analyse ab.

Anhand der „k-mean clustering“-Analyse sind drei Profilgruppen zu erkennen, welche mit den visuell ermittelten Profilen übereinstimmen. So wird das Profil H durch rote Punkte dargestellt, das Profil G durch grüne und das Profil D wird durch blaue Punkte repräsentiert. Proben, die keinem Profil zugeordnet werden konnten (mit „k“ gekennzeichnet), wurden mittels der „k-mean clustering“-Analyse dem Cluster des Profils G zugeordnet. Mittels der nicht-linearen Kartierung nach Sammon sind drei Gruppen zu erkennen, welche mit den visuell ermittelten Profilen übereinstimmen. Diese Gruppen sind räumlich voneinander getrennt. Um die Punktwolke, welche Proben mit dem Profil G repräsentiert, streuen Proben, die visuell keinem Profil zugeordnet werden konnten.



**Abbildung 17: Gruppierung der visuell ermittelten EmsB-Profile mittels Sammons nicht-linearer Kartierung mit k-mean-clustering.** Die Farben Rot, Grün und Blau repräsentieren die drei Cluster. Die Position der Punkte stellt die Ergebnisse der „Sammon’s non-linear Mapping“-Analyse dar. Punkte mit der Beschriftung H repräsentieren Proben mit EmsB-Profil H, G Proben mit dem Profil G und D Proben mit dem Profil D. Proben, denen visuell kein Profil zugeordnet werden konnte, sind durch k gekennzeichnet.

## 5.3 Phylogenie

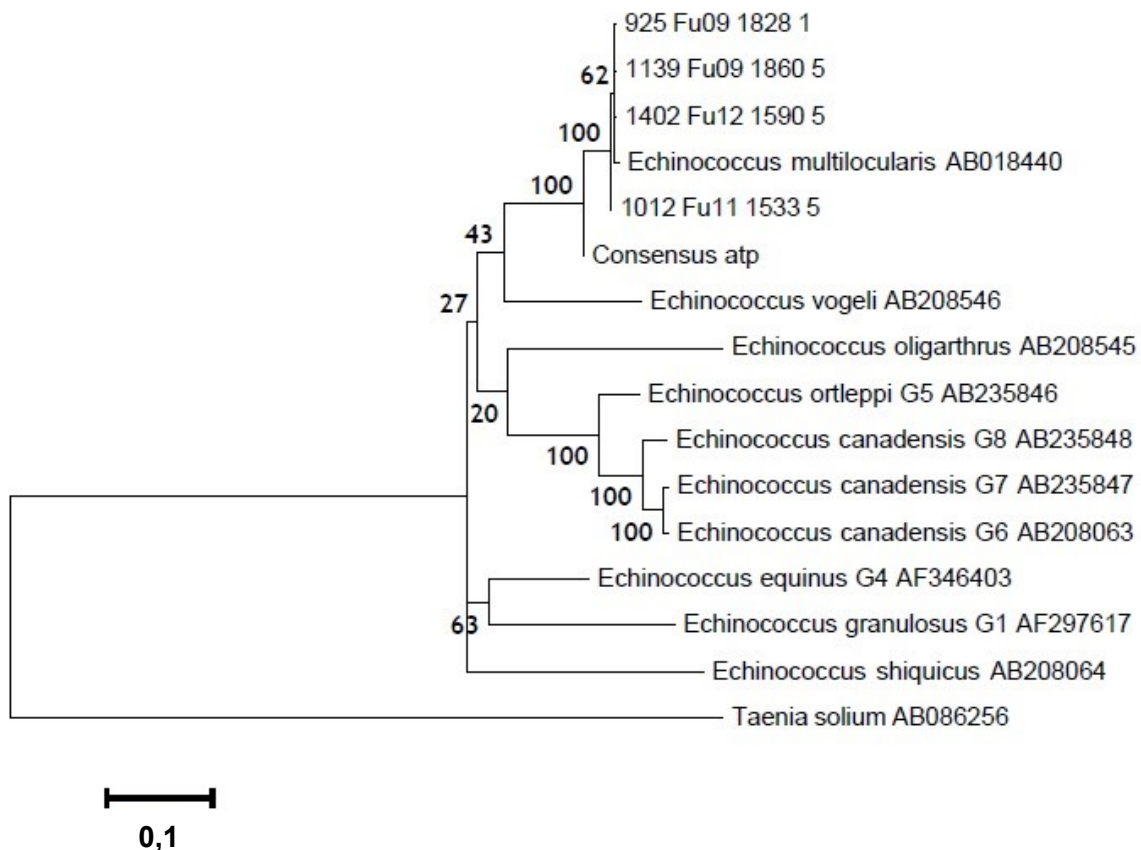
### 5.3.1 Phylogenetische Untersuchungen anhand der Nukleotidsequenzen

Für die phylogenetischen Untersuchungen wurden die in dieser Arbeit ermittelten Sequenzen sowie die in der Datenbank NCBI verfügbaren Daten verwendet. Für alle drei mitochondrialen Marker wurde eine BLAST-Analyse durchgeführt, um die Sequenzergebnisse zu überprüfen. Hierzu wurden für jeden Marker zum einen die Fragmente, welche einen SNP aufwiesen, und zum anderen die Konsenssequenz aller in der vorliegenden Arbeit ermittelten Sequenzen mit den Datenbankeinträgen abgeglichen. Weiterhin wurden für alle drei Marker Dendrogramme erstellt. Damit es nicht zu einer Verzerrung des phylogenetischen Zusammenhanges kam, wurden die Sequenzen mit den jeweiligen SNPs und die Konsenssequenz der genetisch identischen Fragmente nur einmal verwendet. Für die Erstellung der Dendrogramme wurden nur Sequenzen eingesetzt, bei denen die Nukleotidsequenzen für den gesamten Markerabschnitt vollständig waren. Um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden Dendrogramme mittels der in der Arbeit von Nakao *et al.* (Nakao *et al.*, 2007) verwendeten Sequenzinformationen erstellt.



## Ergebnisse

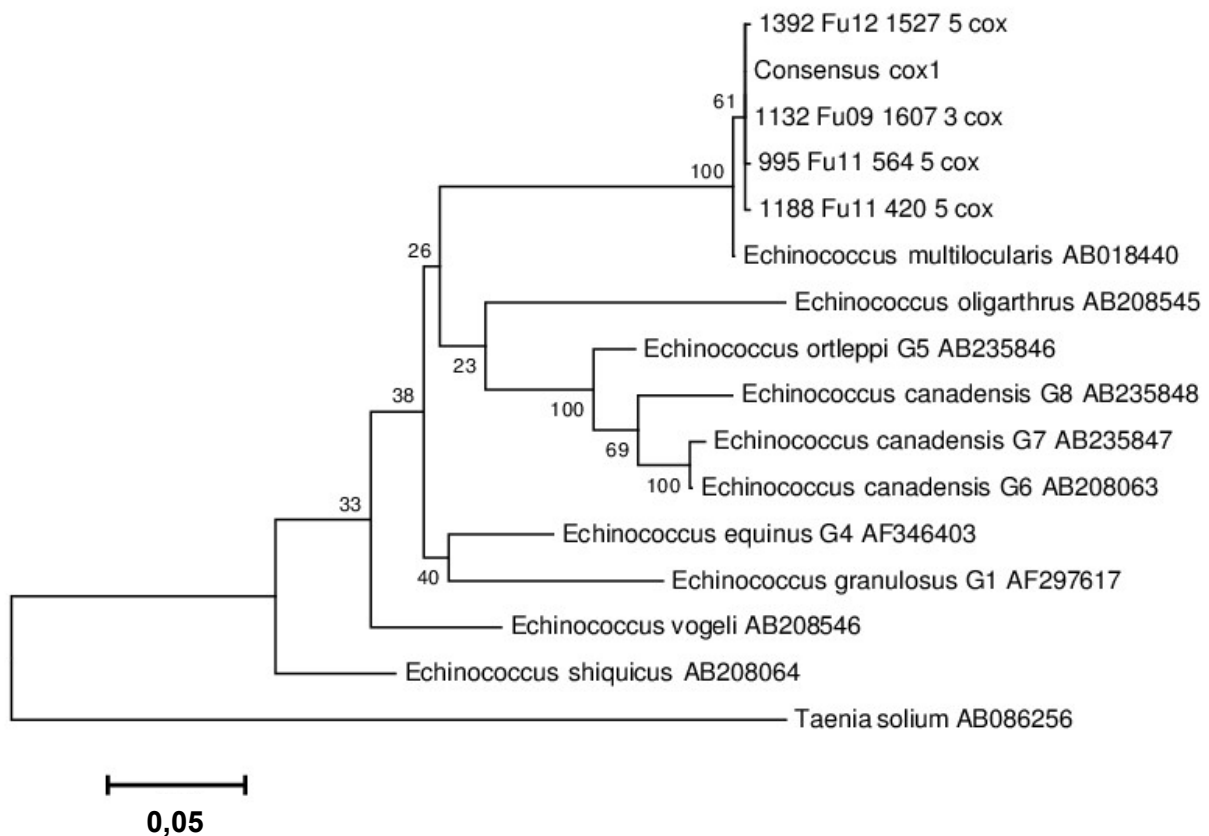
Die in dieser Arbeit ermittelten Sequenzen für das *atp6*-Gen können mit Hilfe der phylogenetischen Analyse alle der Spezies *E. multilocularis* zugeordnet werden (Abbildung 18). *E. vogeli* bildet mit *E. multilocularis* eine Klade, jedoch mit geringer Bootstrap-Unterstützung. Die monophyletische Gruppe, welche *E. orteppi* und die Genotypen *E. canadensis* G8, G7 und G6 umfasst, konnte mit hohen Bootstrapwerten bestätigt werden. *E. oligarthrus* (*E. oligarthra*) ist eine Schwestergruppe dieser Klade, jedoch mit einem geringeren Bootstrapverhältnis. *E. equinus* und *E. granulosus sensu stricto* bilden zusammen ebenfalls eine Klade. *E. shiquicus* wurde einem unabhängigen Zweig zugeordnet.



**Abbildung 18:** Dendrogramm konstruiert mit dem *atp6*-Gen-Daten der Konsenssequenz aller in dieser Arbeit ermittelten Isolate, den Sequenzen mit den jeweiligen SNPs sowie den Sequenzen entnommen aus einer Publikation von Nakao und Kollegen (Nakao *et al.*, 2007). Bootstrapwerte (%) sind an den Zweigen gezeigt.

## Ergebnisse

Auch die phylogenetische Analyse der Sequenzen des *cox1* Gen-Segments ordnet alle Proben, die in dieser Arbeit untersucht wurden, der Spezies *E. multilocularis* zu (Abbildung 19). Die Proben der vorliegenden Arbeit bilden dabei eine eigene Klade innerhalb des *E. multilocularis*-Monophylums. Die Daten zum *cox1*-Marker bestätigen auch die monophyletische Gruppe, welche *E. ortleppi* und die Genotypen *E. canadensis* G8, G7 und G6 umfasst, mit hohen Bootstrapwerten. *E. oligarthrus* (*E. oligarthra*) ist auch bei dieser Analyse eine Schwestergruppe dieser Klade, allerdings mit einem geringen Bootstrapverhältnis. Auch *E. equinus* und *E. granulosus* sensu stricto bilden zusammen eine Klade. Sowohl *E. shiquicus* als auch *E. vogeli* werden jeweils unabhängigen Zweigen zugeordnet.

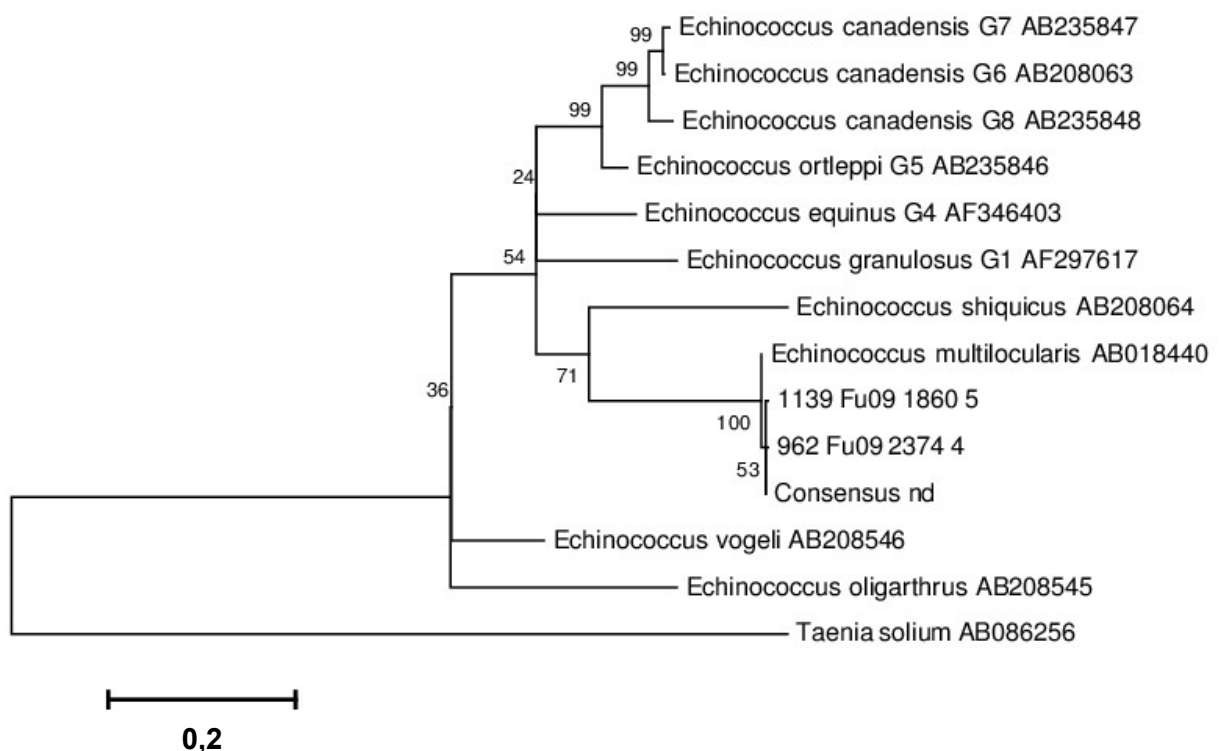


**Abbildung 19:** Dendrogramm abgeleitet von den *cox1*-Gen-Daten der Konsenssequenz aller in dieser Arbeit ermittelten Isolate, den Sequenzen mit den jeweiligen SNPs sowie den Sequenzen entnommen aus einer Publikation von Nakao und Kollegen (Nakao et al., 2007). Bootstrapwerte (%) sind an den Zweigen gezeigt.

Anhand der mit dem *nd1*-Gensegment durchgeführten phylogenetischen Analyse konnten die Isolate der vorliegenden Arbeit ebenfalls der Spezies *E. multilocularis* zugeordnet werden (Abbildung 20). Die Proben aus dieser Studie bilden dabei eine

## Ergebnisse

eigene Klade innerhalb des *E. multilocularis*-Monophylums. Die *E. multilocularis*-Klade ist dabei eine Schwestergruppe von *E. shiquicus*. Alle Kladen konnten mit hohen Bootstrapwerten bestätigt werden. Das Gleiche gilt für die monophyletische Gruppe, die aus *E. ortleppi* und den Genotypen *E. canadensis* G8, G7 und G6 gebildet wurde. Zwischen diesen Kladen wurden *E. granulosus* und *E. equinus* jeweils einem unabhängigen Zweig zugeordnet. Die Bootstrapverhältnisse sind geringer als in den davor beschriebenen Kladen. Sowohl *E. oligarthrus* (*E. oligarthra*) als auch *E. vogeli* bilden jeweils einen unabhängigen Zweig.



**Abbildung 20:** Dendrogramm konstruiert mit dem nd1-Gen-Daten der Konsenssequenz aller in dieser Arbeit ermittelten Isolate, den Sequenzen mit den jeweiligen SNPs sowie den Sequenzen entnommen aus einer Publikation von Nakao und Kollegen (Nakao *et al.*, 2007). Bootstrapwerte (%) sind an den Zweigen gezeigt.

Die phylogenetischen Untersuchungen mittels der *atp6*-Gensequenzen und Sequenzinformationen aus der Gendatenbank NCBI (Abbildung 21) ordneten die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Isolate in einem Monophylum mit Isolaten aus Rumänien, Österreich und Deutschland ein. Mit Bootstrapwerten über 60 % clusterten Isolate aus China, Hokkaido (Japan) und Alaska in einer Klade zusammen, wobei Isolate aus Hokkaido und Alaska eine Untergruppe bildeten.



**Abbildung 21:** Dendrogramm konstruiert mit dem atp6-Gen-Daten der Konsenssequenz aller in dieser Arbeit ermittelten Isolate, den Sequenzen mit den jeweiligen SNPs sowie den verfügbaren Sequenzinformationen aus der NCBI-Datenbank. Bootstrapwerte (%) sind an den Zweigen gezeigt.

Die phylogenetischen Untersuchungen mittels cox1-Gensequenzen und Sequenzinformationen aus der Gendatenbank NCBI gruppieren die untersuchten Isolate in ein Monophylum mit Isolaten aus der Slowakei, Russland, Österreich, Frankreich und Kanada mit einem moderaten Bootstrapwert von 70 % ein (Abbildung 22). Die Isolate aus Kanada (KC550004 und KC550007) bilden dabei eine eigene Untergruppe. Das Isolat aus Österreich (AB461412) und das Isolat Fu/2012/1527 mit dem SNP im cox1-Gen aus Brandenburg bilden zusammen eine Untergruppe im Monophylum der Isolate aus der Slowakei, Russland, Österreich, Frankreich und Kanada. Diese Klade ist eine Untergruppe der Klade, welche sich aus Isolaten aus China, Kasachstan, Russland, Südkorea und Japan zusammensetzt. Die Aufteilung erfolgte mit Bootstrapwerten um

## Ergebnisse

---

50 %. Proben aus den USA, Russland und der St. Lawrence Insel (Alaska) bildeten eine weitere Klade. Das Isolat AB510024 aus der Mongolei wurde in einen unabhängigen Zweig aufgeteilt. Weitere Proben aus der Mongolei, China (Innere Mongolei) und Russland bildeten eine separate Klade mit Bootstrapwerten von 61 bis 96 %.

Die phylogenetischen Untersuchungen mittels *nd1*-Gensequenzen und Sequenzinformationen aus den Gendatenbank NCBI (Abbildung 23) ordneten die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Isolate in ein Monophylum mit Isolaten aus Polen (JX266825, JX266826), Estland (AY855918), China (AY389984) und Kanada ein. Diese Klade ist eine Untergruppe der Hauptklade, welche von Proben aus dem Iran, Japan, China und dem Genotyp M1 nach Bowles und McManus (Bowles *et al.*, 1993b) gebildet wird. Einen separaten Zweig bildet der Genotyp M2 nach Bowles und McManus (Bowles *et al.*, 1993b). Das dritte Hauptcluster beinhaltet ausschließlich Isolate aus Kanada.

# Ergebnisse

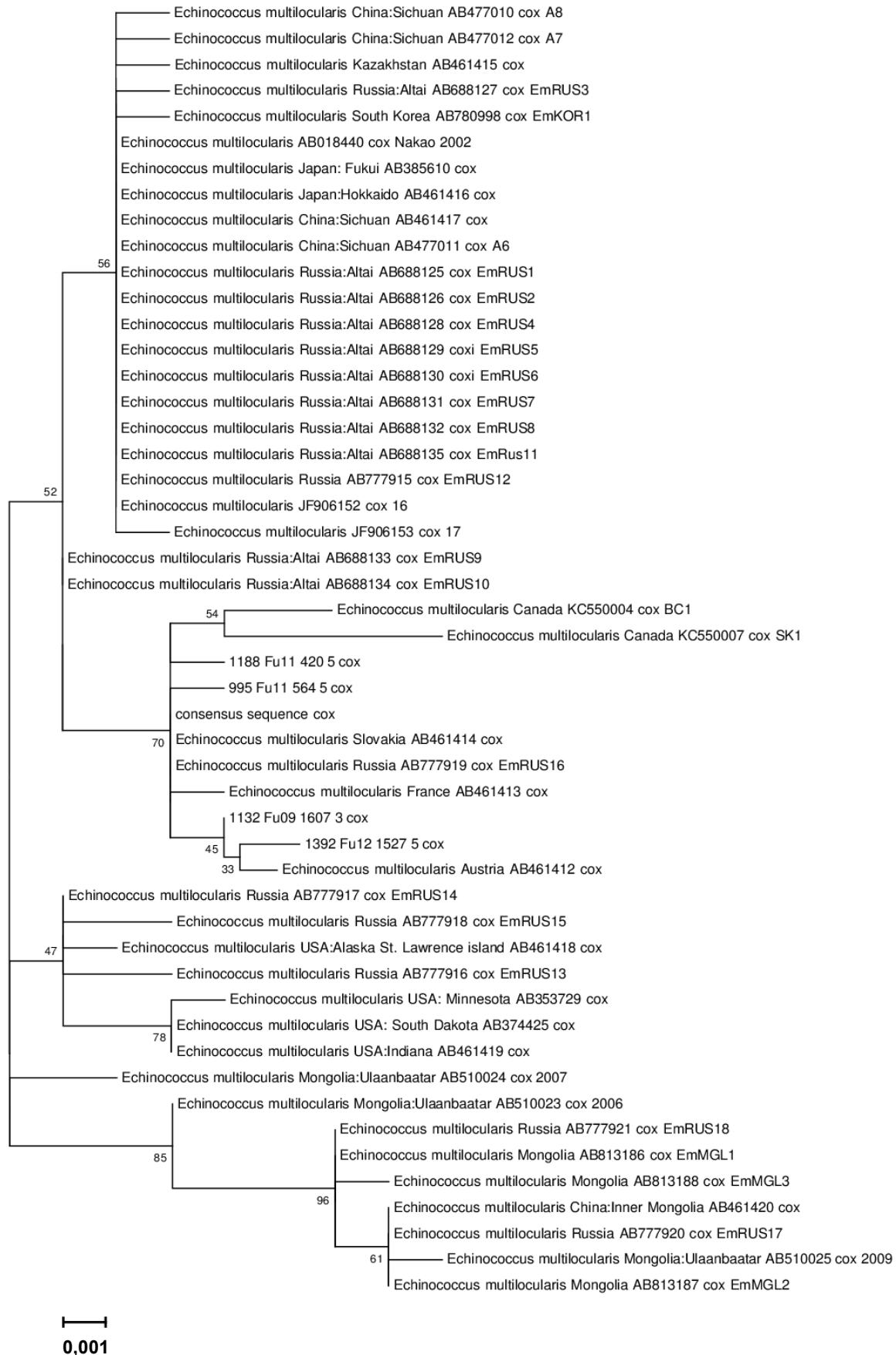
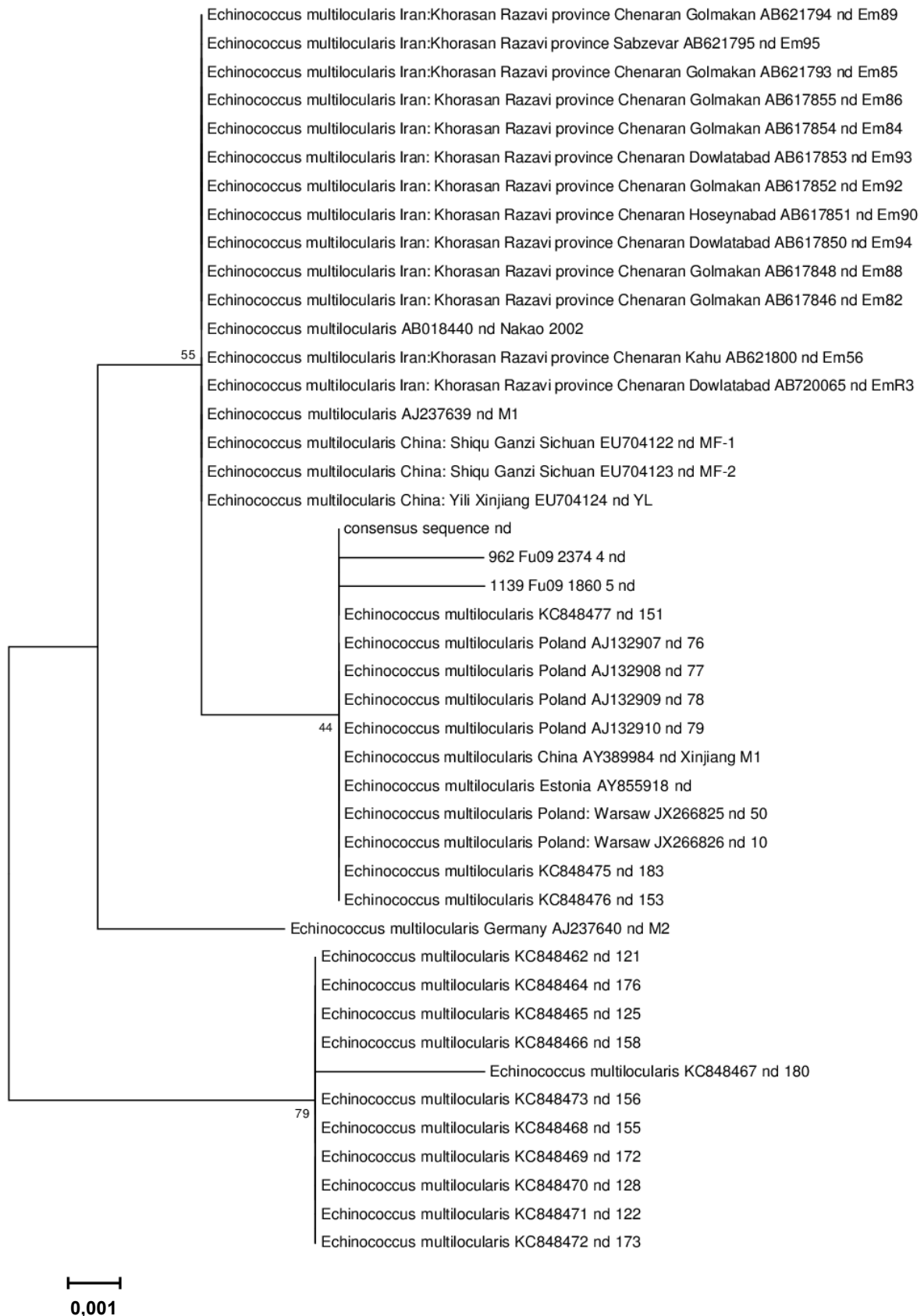


Abbildung 22: Dendrogramm abgeleitet aus den cox1-Gen-Daten der Konsenssequenz aller in dieser Arbeit ermittelten Isolate, den Sequenzen mit den jeweiligen SNPs sowie den verfügbaren Sequenzinformationen aus der NCBI-Datenbank. Bootstrapwerte (%) sind an den Zweigen gezeigt.

## Ergebnisse

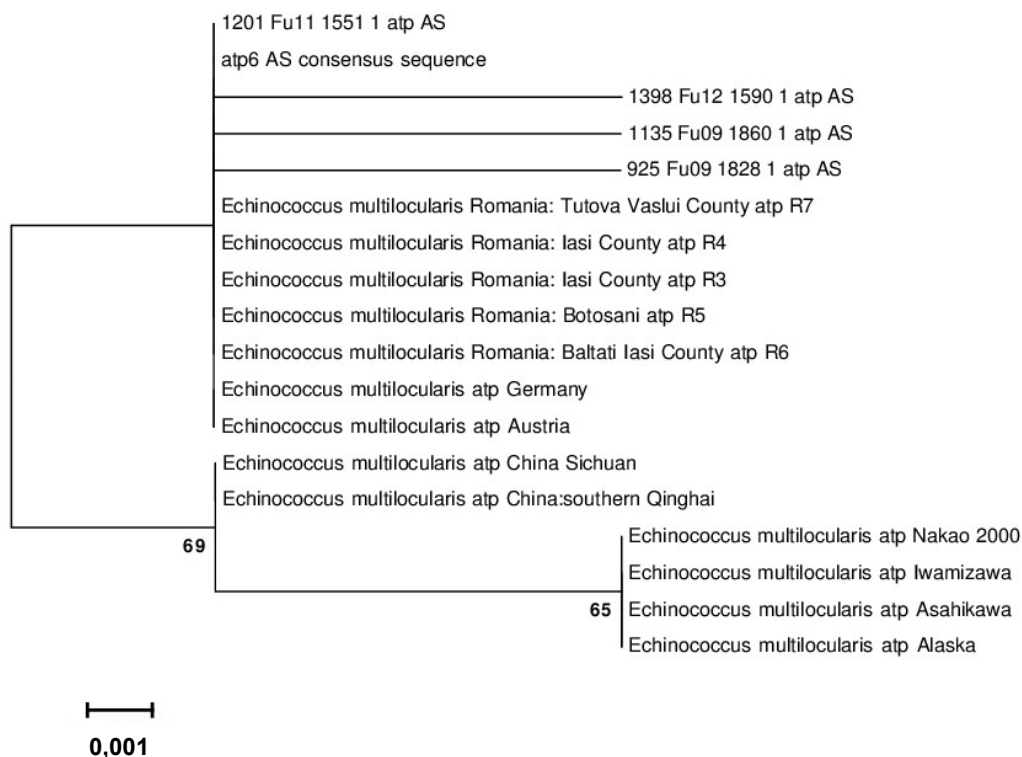


**Abbildung 23: Dendrogramm konstruiert aus den nd1-Gen-Daten der Konsenssequenz aller in dieser Arbeit ermittelten Isolate, den Sequenzen mit den jeweiligen SNPs sowie den verfügbaren Sequenzinformationen aus der NCBI-Datenbank. Bootstrapwerte (%) sind an den Zweigen gezeigt.**

### 5.3.2 Phylogenetische Untersuchungen anhand von Aminosäuresequenzen

Für die phylogenetischen Untersuchungen wurden die Aminosäuresequenzinformationen aus der NCBI-Datenbank genutzt. Dazu wurde mittels der Geneious-Software eine BLAST-Analyse durchgeführt. Die sich aus der Suche ergebenden Sequenzen wurden für die Erstellung der Dendrogramme unter Verwendung des ML- und des Jones-Taylor-Thornton (JTT)-Modells (Tamura *et al.*, 2011; Yang, 1994) verwendet. Aufgrund der kurzen Aminosäuresequenzen und der geringen Unterschiede zwischen den Sequenzen konnten Dendrogramme mit ähnlichen Verwandtschaftsverhältnissen wie in den Nukleotid-Dendrogrammen berechnet werden. Die Dendrogramme sind in den folgenden Abbildungen dargestellt.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Isolate wurden anhand der phylogenetischen Untersuchungen mittels atp6-AS-Sequenzdaten und AS-Sequenzinformationen aus der Gendatenbank NCBI (Abbildung 24) ähnlich den Ergebnissen der phylogenetischen Analyse mit den Nukleotidsequenzen in ein Monophylum mit Isolaten aus Rumänien, Österreich und Deutschland gruppiert. Wie bei den Nukleotidsequenzen wird ein zweites Cluster von Isolaten aus China, Hokkaido (Japan) und Alaska gebildet, bei denen ebenfalls eine Untergruppe von Isolaten aus Hokkaido und Alaska besteht.



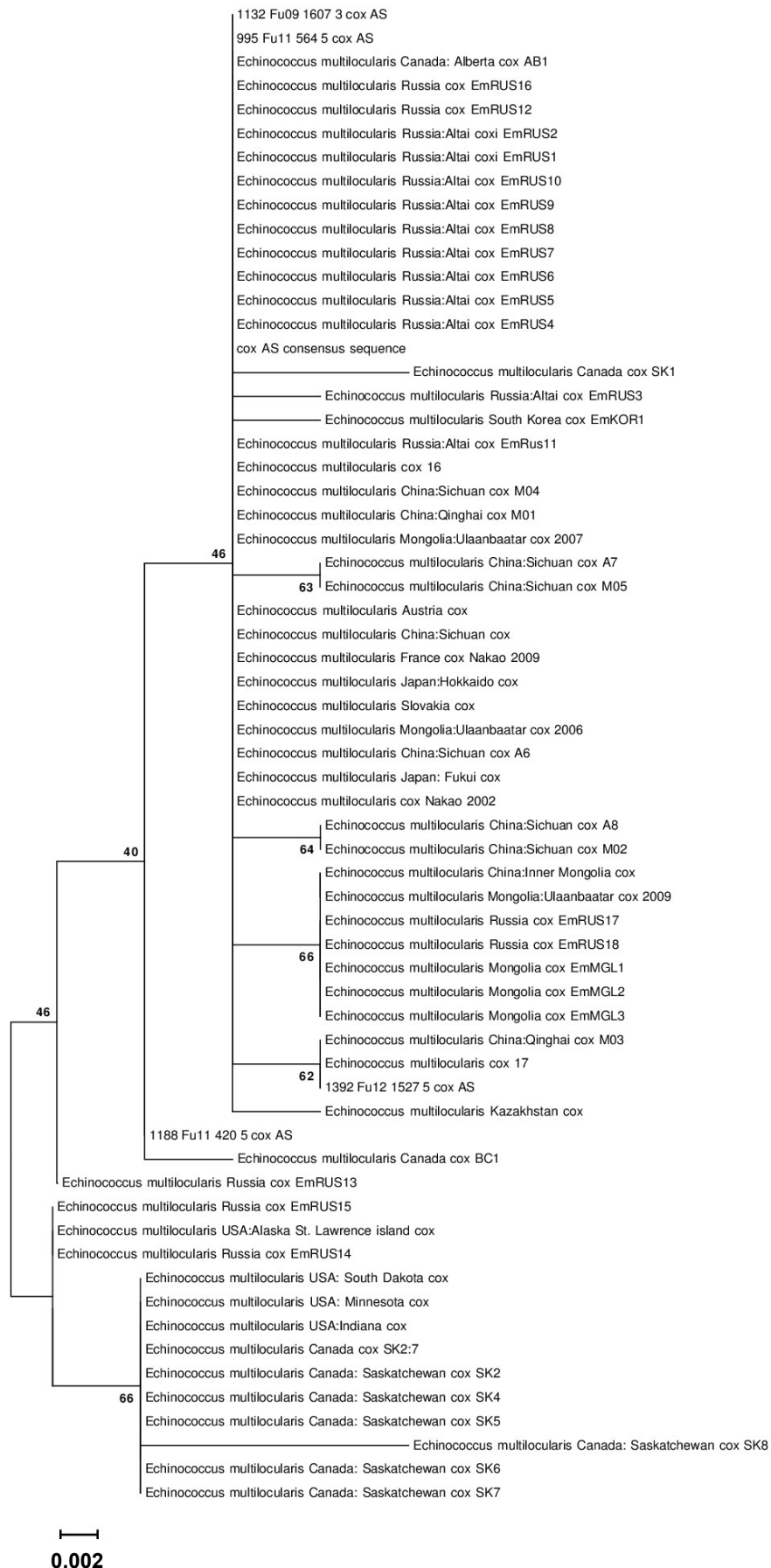
**Abbildung 24:** AS-Dendrogramm abgeleitet aus den atp6-AS-Daten der Konsensussequenz aller in dieser Arbeit ermittelten Isolate, den AS-Sequenzen mit den jeweiligen SNPs sowie den verfügbaren AS-Sequenzinformationen aus der NCBI-Datenbank. Bootstrapwerte (%) sind an den Zweigen gezeigt.



Auch bei der phylogenetischen Analyse mittels *cox1*-Marker auf Basis der AS-Sequenzen konnten zwei Kladen festgestellt werden (Abbildung 25). In der einen Klade wurden AS-Sequenzinformationen von Proben aus Kanada, den USA und Russland gruppiert. Dieses Monophylum besteht aus zwei Untergruppen: Eine Klade wird aus Isolaten aus Russland und Alaska gebildet, die andere gruppiert Proben aus Kanada und den USA zusammen. In der zweiten Hauptklade clusterten die in dieser Arbeit ermittelten AS-Sequenzen zusammen mit Proben aus Russland, China, Österreich, Frankreich, der Mongolei, Japan, der Slowakei und Kanada.

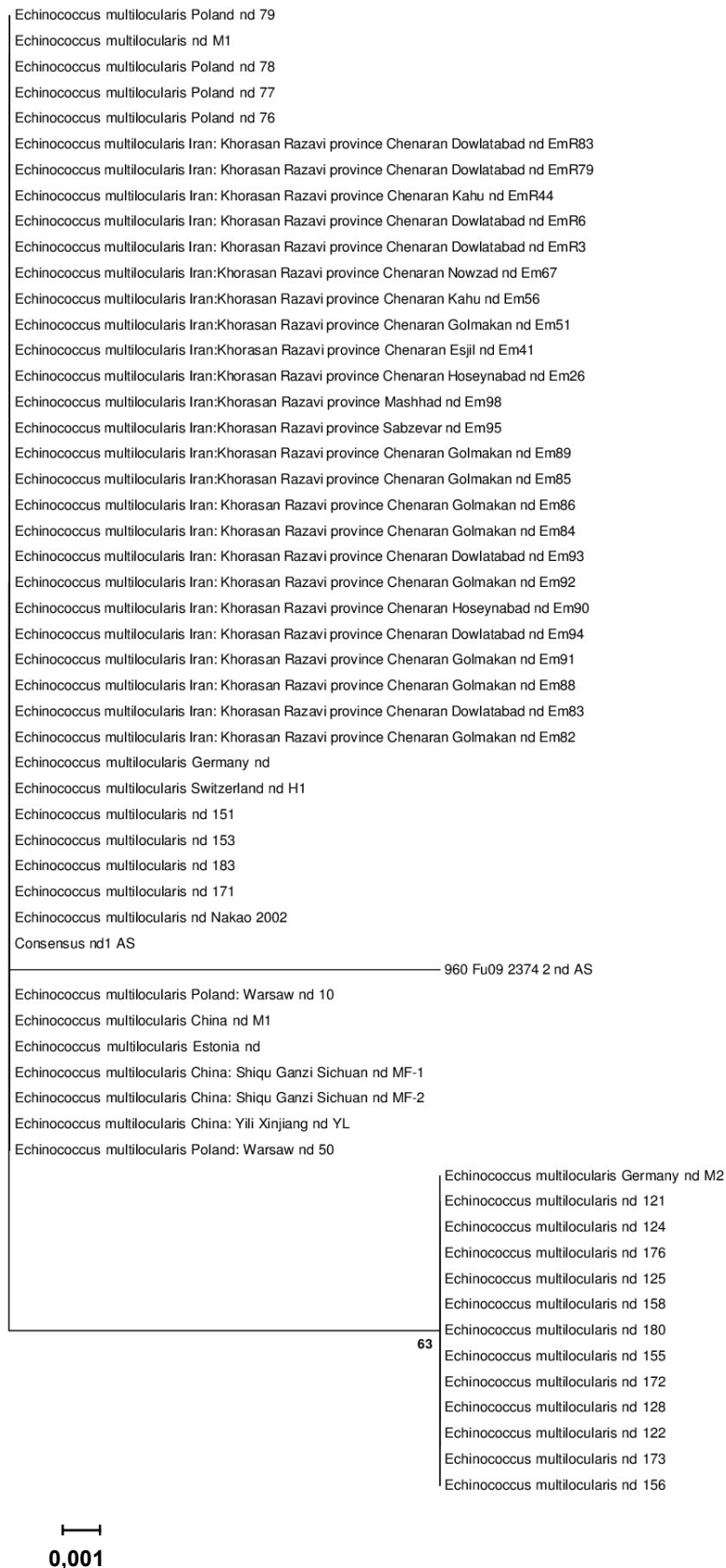
Die phylogenetische Analyse mittels *nd1*-AS-Daten ergab zwei Cluster (Abbildung 26). Das erste Cluster wird von Isolaten aus der vorliegenden Arbeit, aus Polen, dem Iran, Österreich, Schweiz, Japan, China, Estland, Kanada und dem Genotypen M1 gebildet. In dem zweiten Cluster finden sich ausschließlich Proben aus Kanada und der Genotyp M2 nach Bowles und McManus (Bowles *et al.*, 1993b).

# Ergebnisse



**Abbildung 25: AS-Dendrogramm konstruiert aus den cox1-AS-Daten der vorliegenden Arbeit sowie den verfügbaren cox1-AS-Sequenzen aus der NCBI-Datenbank. Bootstrapwerte (%) sind an den Zweigen gezeigt.**

# Ergebnisse



**Abbildung 26: AS-Dendrogramm abgeleitet aus den nd1-AS-Daten der Konsenssequenz aller in dieser Arbeit ermittelten Isolate, den AS-Sequenzen mit den jeweiligen SNPs sowie den verfügbaren AS-Sequenzinformationen aus der NCBI-Datenbank. Bootstrapwerte (%) sind an den Zweigen gezeigt.**

### 5.4 Räumliche Verteilung

#### 5.4.1 Räumliche Verteilung von mitochondrialen Genotypen

Anhand der Fundorte der Füchse wurden die geografischen Positionen der jeweiligen Wurmisolate dargestellt.

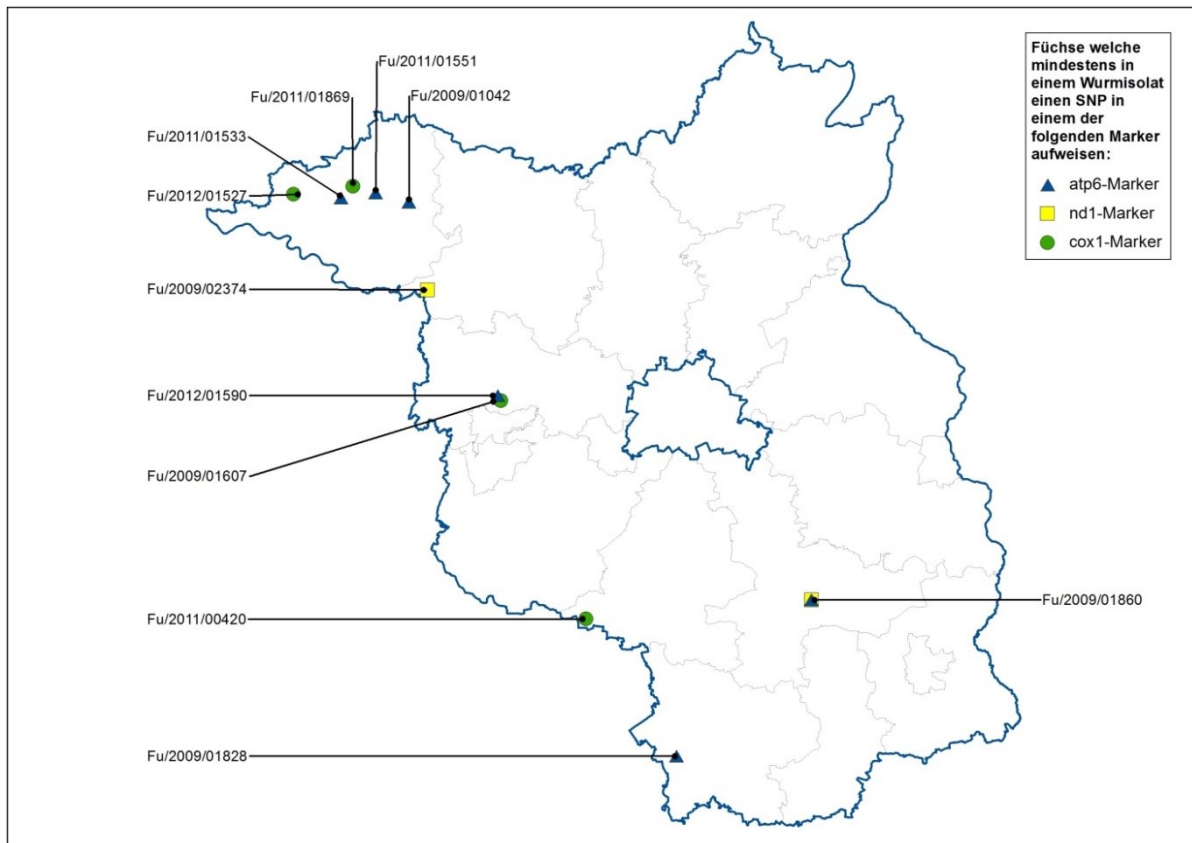
In Brandenburg wurden sechs Füchse mit mindestens einer unterschiedlichen *atp6*-Sequenz für die jeweiligen Wurmisolate identifiziert (Abbildung 27 A, blaue Dreiecke). Wurmisolate der drei Füchse Fu/2011/1533, Fu/2011/1551 und Fu/2009/1042 wiesen den gleichen SNP in der *atp6*-Gensequenz auf. Zwei der Füchse wurden im Jahr 2011 und einer im Jahr 2009 in einer Entfernung von ca. 20 km im Landkreis Prignitz erlegt.

Bei vier Füchsen wurden mindestens bei einem von fünf Wurmisolaten Unterschiede in der *cox1*-Sequenz nachgewiesen (Abbildung 27 A, grüne Kreise). Bei zwei der vier Füchse wurden Wurmisolate mit dem gleichen SNP im *cox1*-Gen identifiziert. Diese beiden Füchse waren in den Jahren 2009 und 2011 in einer Entfernung von ca. 80 km gestreckt worden. Alle fünf Wurmisolate des Fuchses Fu/2011/1869 aus dem Landkreis Prignitz wiesen diesen SNP im *cox1*-Gen auf. Bei dem Fuchs Fu/2009/1607, welcher im Landkreis Havelland gestreckt worden war, wurde bei einem von fünf Wurmisolaten derselbe SNP nachgewiesen.

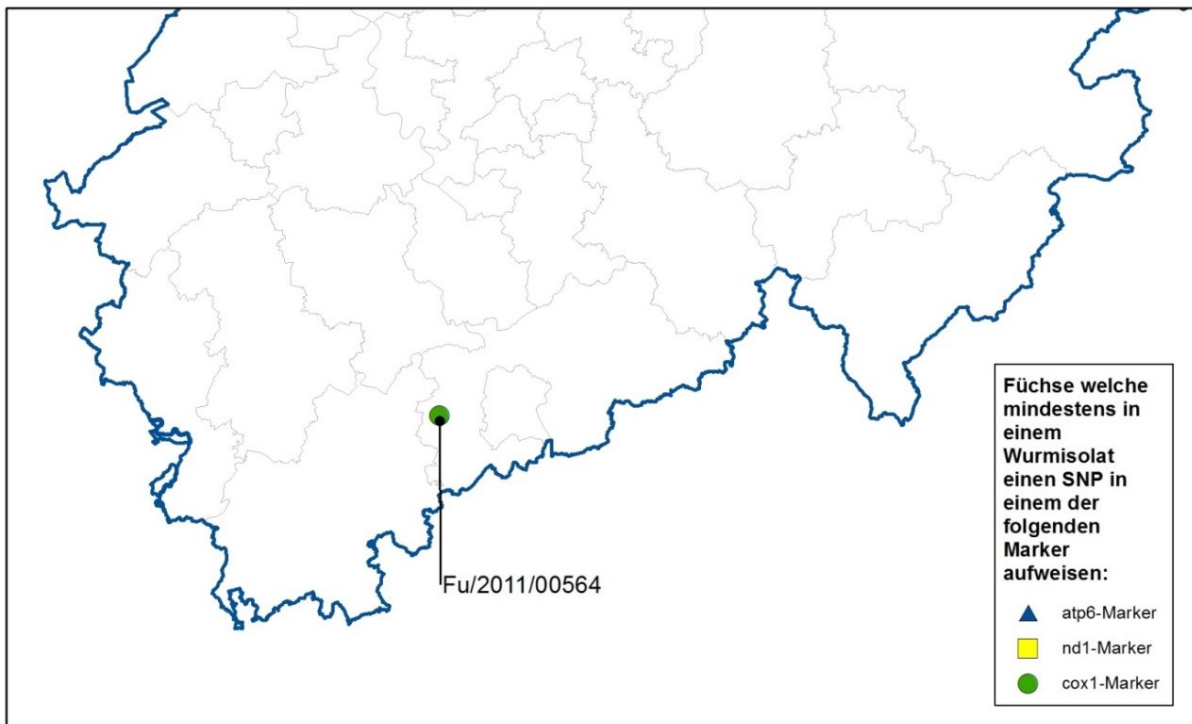
Bei Fuchs Fu/2009/1860, welcher im Kreis Dahme-Spree gestreckt worden war, wurden fünf *E. multilocularis*-Exemplare isoliert, welche sich sowohl in der *atp6*- als auch in der *nd1*-Sequenz (Abbildung 27 A, gelbe Quadrate) an einer Nukleotidposition im Vergleich mit allen anderen Wurmisolaten der übrigen Füchse unterschieden.

In Nordrhein-Westfalen unterschied sich bei dem Fuchs Fu/2011/564 eines von fünf Wurmisolaten in der *cox1*-Sequenz (Abbildung 27 B, grüne Kreise).

A)



B)



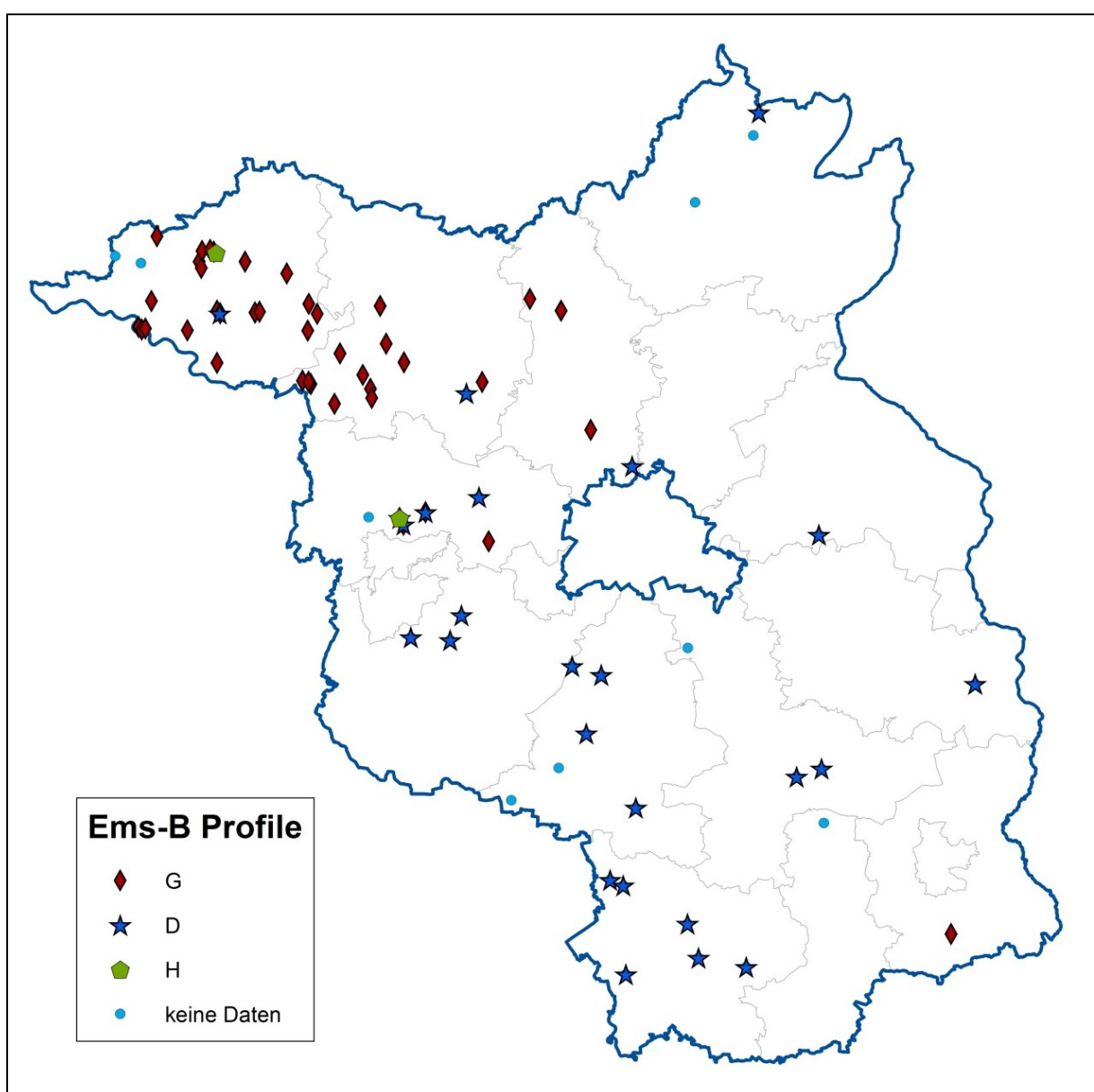
**Abbildung 27: Geografische Darstellung der Sequenzunterschiede A) in Brandenburg und B) in Nordrhein-Westfalen.** Es wird die Position der Füchse mit mindestens einem SNP in einem Parasitenisolat gezeigt. Blaue Dreiecke stellen die Positionen der Füchse dar, die mindestens ein *E. multilocularis*-Isolat mit einem SNP im atp6-Gen aufwiesen. Gelbe Quadrate repräsentieren die Position der Füchse mit Parasiten mit Unterschieden im nd1-Gen und die grünen Kreise zeigen die Position von Füchsen, die von Parasiten befallen waren, die einen Unterschied in der cox1-Gensequenz aufwiesen.

### **5.4.2 Räumliche Verteilung von EmsB-Profilen**

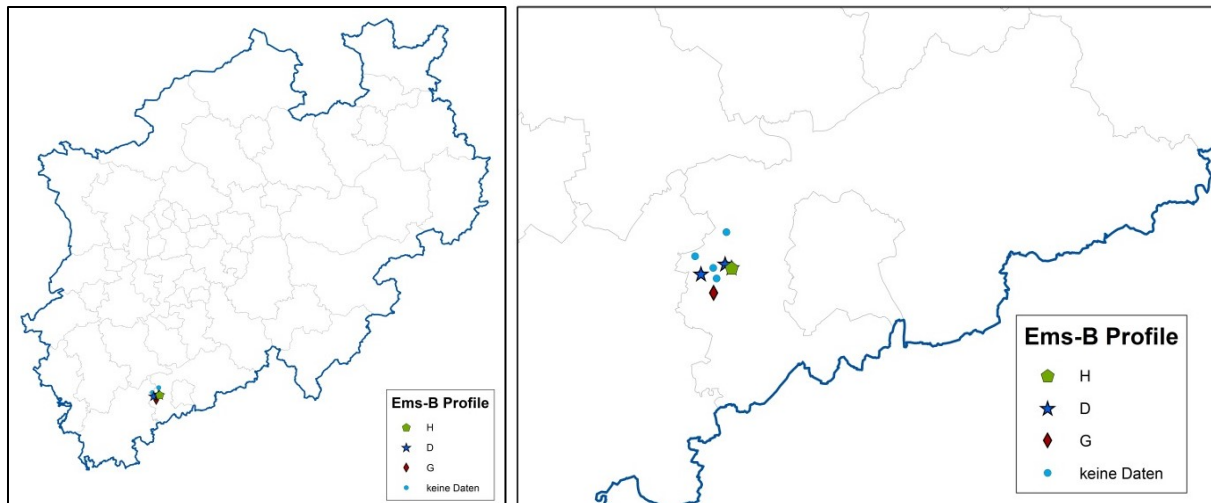
Anhand der ortsbezogenen Daten der Fuchswirte wurden die EmsB-Profile durch Füchse, welche in der optischen Auswertung der EmsB Profile bei allen fünf Wurmisolaten das gleiche Profil aufwiesen (n = 90) räumlich dargestellt.

Das Profil G (rote Rauten) (Abbildung 28) wurde überwiegend im nordwestlichen Brandenburg in den Landkreisen Prignitz und Ostprignitz-Ruppin nachgewiesen. Dagegen wurde das Profil D (blaue Sterne) überwiegend im mittleren und südlichen Brandenburg gefunden.

Bei insgesamt drei Füchsen konnte bei allen fünf Wurmisolaten das Profil H (grüne Pentagone) nachgewiesen werden. Zwei der drei Füchse wurden in Brandenburg gestreckt, der dritte in Nordrhein-Westfalen (Abbildung 29). Weiterhin wurde in Nordrhein-Westfalen das Profil D in allen fünf Wurmisolaten bei zwei Füchsen und das Profil G bei fünf von fünf Parasitenisolaten, die aus einem einzigen Fuchs stammten, gefunden.



**Abbildung 28: Geografische Darstellung der optisch ermittelten EmsB-Profilen in Brandenburg.** Dargestellt sind die Positionen der Füchse, bei denen für alle fünf Wurmisolate das gleiche EmsB-Profil optisch ermittelt wurde. Die rote Raute zeigt Füchse, die mit Wurmisolaten mit dem EmsB-Profil G infiziert waren. Blaue Sterne stellen das Profil D dar und grüne Pentagone das Profil H. Die hellblauen Kreise zeigen die Position der Füchse, für die kein EmsB-Profil für alle Wurmisolate bestimmt werden konnte.

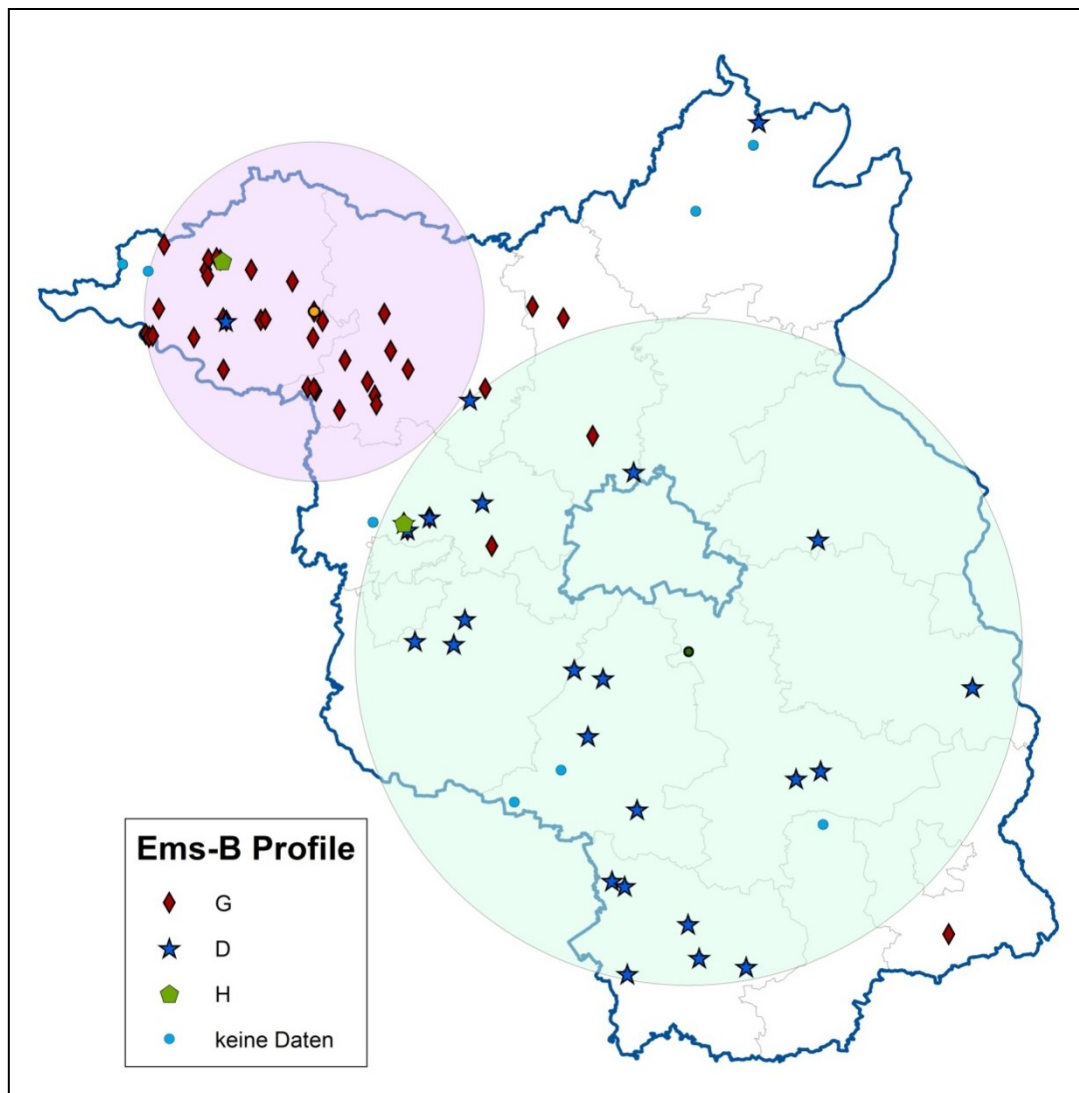


**Abbildung 29: Geografische Darstellung der optisch ermittelten EmsB-Profile in Nordrhein-Westfalen.** Dargestellt sind die Positionen der Füchse, bei denen für alle fünf Wurmisolate das gleiche EmsB-Profil optisch ermittelt wurde. Die rote Raute zeigt Füchse, die mit Wurmisolaten mit dem EmsB-Profil G infiziert waren. Blaue Sterne stellen das Profil D dar und grüne Pentagone das Profil H. Die hellblauen Kreise zeigen die Position der Füchse, für die kein EmsB-Profil für alle Wurmisolate bestimmt werden konnte.

Visuell ist in Brandenburg eine Unterteilung in zwei geografische Gruppen, mit dem Profil G im nordwestlichen Brandenburg und dem Profil D in mittleren und südlichen Gebieten von Brandenburg, zu erkennen.

Die Hypothese einer Unterscheidung von zwei geografisch lokalisierbaren Gruppen mit verschiedenen EmsB-Profilen wurde mit Hilfe einer räumlichen Analyse mittels der Suche nach Clustern mit hohen Raten unter Verwendung eines Bernoulli-Modells mittels SaTScan (<https://www.satscan.org/>) untersucht (Abbildung 30). Hierbei wurden die geografischen Daten der gestreckten Füchse sowie die optisch ermittelten EmsB-Profile der Wurmisolate zugrunde gelegt.





**Abbildung 30: Streckungsorte der Füchse mit zugehörigen EmsB-Profilen der Wurmisolate und Darstellung der Gruppierung mittels SaTScan-Analyse.** Die Positionen der Parasitenisolate, die keinem EmsB-Profil eindeutig zugeordnet werden konnten, sind ebenfalls gekennzeichnet („keine Daten“).

Die Analyse ergab zwei Cluster. Das Cluster 1 (Abbildung 30, violetter Kreis), welches sich im nordwestlichen Brandenburg befindet, umfasst die Füchse mit den Wurmisolaten des Profils G (rote Rauten). Das Cluster 2 (Abbildung 30, blauer Kreis) umfasst das Profil D (blaue Sterne). Es hat seinen Mittelpunkt südlich von Berlin, etwa in der Mitte von Brandenburg und erstreckt sich über das mittlere und südliche Brandenburg.

Für das Profil H und die ihm zugeordneten Füchse ( $n = 2$ ) wurde weder ein eigenes Cluster erzeugt noch konnte es in eines der beiden anderen Cluster eingerechnet werden.

## 6. Diskussion

### 6.1 Typisierung mit Hilfe genetischer Marker aus dem mitochondrialen Genom

Die Nutzung der Sanger-Sequenzierung für die Analyse der genetischen Vielfalt der Gattung *Echinococcus* mittels mitochondrialer Marker begann Anfang der 1990er Jahre mit den Arbeiten von Bowles *et al.* 1992 (Bowles *et al.*, 1992) und ein Jahr später von Bowles und McManus (Bowles *et al.*, 1993b). Für ihre Studien verwendeten diese Autoren einen Sequenzabschnitt aus dem Gen der Untereinheit 1 der Cytochrom c-Oxidase. In den folgenden Jahren wurden weitere Studien mit diesem und mit anderen mitochondrialen Markern durchgeführt. Auch wenn in vielen Studien die genetische Vielfalt von *E. granulosus* gezeigt werden konnte (Bowles *et al.*, 1992, 1994; Bowles *et al.*, 1993a; Lymbery, 2017), ist die genetische Diversität der Art *E. multilocularis* umstritten. In den 1990er Jahren wiesen die Studien von Bowles (Bowles *et al.*, 1992; Bowles *et al.*, 1993b) darauf hin, dass anhand der verwendeten Marker zwei Genotypen unterschieden und geografisch zugeordnet werden konnten. Allerdings ist diese Unterscheidung sehr grob und eignet sich nicht für eine kleinräumige Analyse. Dies wurde auch von Rinder *et al.* bestätigt (Rinder *et al.*, 1997). In den folgenden Jahren deuteten weitere Arbeiten darauf hin, dass unter Analyse weiterer mitochondrialer Marker sowie Marker aus dem Genom von *E. multilocularis* eine feinere Differenzierung der Art möglich ist (Davidson *et al.*, 2012; Nakao *et al.*, 2009).

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb eine große Anzahl von Proben aus einem begrenzten geografischen Bereich hinsichtlich ihrer genetischen Vielfalt mit anderen Markern untersucht. Dazu wurden drei mitochondriale Marker (Cytochrom c-Oxidase, Untereinheit 1, *cox1*, NADH-Dehydrogenase, Untereinheit 1 und ATP-Synthase Untereinheit 6) und ein nuklearer Marker (Mikrosatellit EmsB) verwendet.

#### 6.1.1 Cytochrom-c-Oxidase, Untereinheit 1

Mit der Arbeit von Bowles und Kollegen aus dem Jahr 1992 (Bowles *et al.*, 1992) begann die Nutzung der *cox1* als Marker für die Identifizierung und Differenzierung der Gattung *Echinococcus* und damit auch die Verwendung des Markers zur Genotypisierung der Art *E. multilocularis*. Die Verwendung dieses Markers als Untersuchungswerkzeug für *E. multilocularis* über zwei Jahrzehnte und die daraus resultierende große Anzahl an

## Diskussion

---

Vergleichsdaten führten zu der Entscheidung, diesen Marker auch in der vorliegenden Arbeit zu verwenden.

Mit Hilfe des *cox1*-Markers wurden insgesamt vier verschiedene SNPs im Vergleich aller in dieser Arbeit untersuchten Proben gefunden. Weiterhin konnte bei vier Füchsen eine Mischinfektion mit jeweils unterschiedlichen SNPs in den Wurmisolaten festgestellt werden. Ein SNP wurde bei Parasitenisolaten aus zwei verschiedenen Füchsen nachgewiesen. Dies lässt darauf schließen, dass sich beide Füchse mit dem gleichen Parasitengenotyp infiziert hatten. In der Vergangenheit wurden nur wenige Polymorphismen für das *cox1*-Gen für *E. multilocularis* beschrieben (Boucher *et al.*, 2005; Bowles *et al.*, 1992). Ein Grund dafür, war vermutlich die geringe Anzahl von Proben, die für diese Studien zur Verfügung standen. Der in der vorliegenden Arbeit untersuchte Probenumfang ist weitaus größer, zeigt aber dennoch eine vergleichsweise geringe genetische Variabilität bezüglich des *cox1*-Markers in der Stichprobe im ausgewählten Untersuchungsgebiet.

Anhand der Untersuchungen der AS-Sequenzen zeigte sich eine ähnliche Variabilität der untersuchten Parasitenisolate. Drei der vier SNPs hatten einen AS-Austausch zur Folge, anhand dessen die AS-Sequenzen unterschieden werden konnten.

### 6.1.2 NADH-Dehydrogenase, Untereinheit 1

Der Genabschnitt *nd1* wurde erstmals 1993 in der Studie von Bowles *et al.* (Bowles *et al.*, 1993b) für die genetische Untersuchung von *E. multilocularis* herangezogen und in den folgenden Jahren in weiteren Arbeiten verwendet. Zur Überprüfung und für eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde auch dieser Marker für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen verwendet.

Mit Hilfe des *nd1*-Markers konnten in der vorliegenden Arbeit zwei verschiedene SNPs in unterschiedlichen Wurmisolaten nachgewiesen werden. Außerdem wurde mit diesem Marker eine Mischinfektion eines Fuchses mit verschiedenen Genotypen der Parasiten detektiert. In der Literatur sind verschiedene andere SNPs beschrieben, von denen jedoch keiner bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Proben gefunden wurde. Im Vergleich zu den anderen hier untersuchten Markern konnten mit *nd1* weniger Polymorphismen identifiziert werden. Dies könnte daran liegen, dass im Vergleich zu den beiden anderen verwendeten mitochondrialen Markern nur ein kurzer Genabschnitt des *nd1*-Gens für die Untersuchungen verwendet wurde. Alle drei untersuchten Gene sind

## Diskussion

---

hoch konserviert und durch die geringe Größe des gewählten nd1-Gen-Fragments sinkt die Wahrscheinlichkeit, dort Polymorphismen zu finden.

Die Untersuchungen der AS-Sequenzen ergaben, dass einer der SNPs eine Mutation ohne Auswirkung auf die AS-Sequenz und der andere einen AS-Austausch von Glycin zu Serin zur Folge hatte.

Mit dem verwendeten nd1-Marker konnte somit nur eine geringe Variabilität der untersuchten Proben festgestellt werden. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Bowles *et al.* überein (Bowles *et al.*, 1993b). Die alleinige Nutzung dieses Markers erscheint somit weniger geeignet für die Untersuchungen von Proben aus begrenzten geografischen Räumen. Auch Nakao und Kollegen erwähnen in ihrer Publikation von 2003 (Nakao *et al.*, 2003) nicht publizierte Daten, aus denen sich schließen lässt, dass mtDNA Marker keinen zusätzlichen Nutzen in der Untersuchung der genetischen Variabilität von *E. multilocularis* in dem begrenzten Raum von Hokkaido (Japan) brächten. Solche Ergebnisse sollten transparent kommuniziert werden, um ein besseres Verständnis über die Verwendungsbereiche von bekannten Markern zu erhalten. Dadurch könnte eine systematische Auswertung von Studien (zum Beispiel in Form eines „Systematic Review“ oder eine Meta-Analyse) einen besseren Überblick über die Anwendungsgebiete der verwendeten Marker, ihrer Stärken und Schwächen erlauben. In die vorliegende Arbeit wurde nd1 wie auch andere mitochondriale Marker einbezogen, um die Vergleichbarkeit mit anderen Studien zu gewährleisten.

Der Anwendungsbereich der in der vorliegenden Arbeit genutzten Marker wird in den Abschnitten 6.3 und 6.4 ausführlich diskutiert.

### 6.1.3 ATP-Synthase Untereinheit 6

Schon Yang *et al.* konnten 2005 mit Hilfe der Sequenzierung eines atp6-Fragmentes verschiedene SNPs in den Sequenzen von zwei Isolaten aus Zentralchina nachweisen (Yang *et al.*, 2005). In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe des atp6-Markers vier verschiedene SNPs detektiert. Mischinfektionen konnten ebenfalls anhand dieses Markers bei drei Füchsen festgestellt werden. Ein bestimmter SNP wurde in Wurmisolaten von insgesamt drei verschiedenen Füchsen nachgewiesen. Daraus lässt sich schließen, dass sich diese drei Füchse mit dem gleichen Parasitengenotyp infiziert haben.

## Diskussion

---

Bei Fuchs Fu/2009/1860 fand sich in allen fünf Parasitenisolaten je ein gemeinsamer SNP im nd1-Marker und im atp6-Marker. Ein Unterschied in den cox1-Sequenzen als auch in den EmsB-Profilen dieser Wurmisolate zu anderen cox1-Sequenzen und EmsB-Profilen konnte interessanterweise jedoch nicht festgestellt werden. Auch Knapp und Kollegen ermittelten in ihrer Studie keinen Zusammenhang zwischen Ergebnissen, die mit einem atp6-Marker und mit dem EmsB-Marker erzielt wurden (Knapp *et al.*, 2008). Dennoch sprechen sowohl der SNP im nd1- als auch der im atp6-Gen für eine Variabilität der *E. multilocularis*-Isolate dieses Fuchses im Vergleich zu den übrigen in dieser Arbeit untersuchten Wurmisolaten. Nur für diesen Fuchs betrachtet, handelt es sich um eine homogene Parasitenpopulation, mit welcher sich der Fuchs infiziert hat. Die Ursache dafür könnte die Aufnahme von Protoskolyzen eines genetisch homogenen Parasiten sein. Kein anderer in dieser Arbeit untersuchter Fuchs hat sich mit dieser Parasitenpopulation infiziert. Ob es sich bei dieser Parasitenpopulation um eine Brandenburg-spezifische Subpopulation handelt, könnte mit einer Vollgenomsequenzierung geklärt werden. Die Verbreitung und Bedeutung der genannten Population kann aus Mangel an vergleichbaren Daten derzeit nicht eingeschätzt werden.

Ein ähnliches Muster bei den untersuchten Parasitenisolaten zeigte sich auch anhand der Untersuchungen der AS-Sequenzen. Drei der vier SNPs hatten AS-Austausche zur Folge, durch welche die AS-Sequenzen von den Sequenzen anderer Isolate unterschieden werden konnten. Der Austausch von Histidin zu Tyrosin der AS-Sequenzen der Wurmisolate des Fuchses Fu/2009/1860 hat vermutlich eine geringere Bedeutung, da beide aromatische Aminosäuren sind (Taylor, 1986).

Der atp6-Marker wurde bisher in nur wenigen Studien zur Untersuchung der genetischen Vielfalt von *E. multilocularis*-Isolaten verwendet (Fukunaga *et al.*; Nakao *et al.*, 2003; Snabel *et al.*; Yang *et al.*, 2005). Daher mangelt es an Daten zur Verbreitung dieser SNPs in anderen Verbreitungsgebieten von *E. multilocularis* und somit an Vergleichsmöglichkeiten. In dieser Arbeit erwies sich atp-6 als möglicher Marker für die Untersuchung der genetischen Vielfalt von *E. multilocularis* auch in einem begrenzten geografischen Raum.

## 6.2 Mikrosatellitenanalyse

Die Mikrosatellitenanalyse ist eine verbreitete Methode zur Ermittlung der genetischen Vielfalt von Parasiten (Barker, 2002). Erste Anwendung bei *E. multilocularis* fand diese

## Diskussion

---

Methode 1996 in der Arbeit von Bretagne *et al.* unter Verwendung von Polymorphismen im U1-snRNA-Gen (U1 kleine nukleäre RNA-Gen) (Bretagne *et al.*, 1996). Nakao und Kollegen identifizierten 2003 zwei Mikrosatelliten, die sie als EMms1 und EMms2 bezeichneten, und nutzten sie für die Untersuchung von Feldproben aus Hokkaido (Japan) (Nakao *et al.*, 2003). Die beiden genannten Studien sind schwer zu vergleichen, da in ihnen unterschiedliche Mikrosatelliten-Marker verwendet wurden. Jedoch wiesen beide Studien darauf hin, dass eine größere genetische Vielfalt von *E. multilocularis* vorhanden ist als zuvor angenommen.

Mit der Entdeckung des EmsB-Markers durch Bart und Kollegen 2006 (Bart *et al.*, 2006) begann die intensive Anwendung der Mikrosatellitenanalyse zur Untersuchung der genetischen Vielfalt von *E. multilocularis*. Der EmsB-Marker zeichnet sich durch eine Tandem-Wiederholung von (CA)<sub>m</sub> und (GA)<sub>n</sub> aus, gefolgt von einem GGTG-Sequenzabschnitt, an den sich nochmals eine Wiederholung von (GA)<sub>o</sub> anschließt (Bart *et al.*, 2006). Valot und Kollegen bestimmten mit Hilfe der *In-silico*-Analyse die Lage des Mikrosatelliten auf dem Chromosom 5 von *E. multilocularis* (Valot *et al.*, 2015).

Nachdem der EmsB-Marker im Jahre 2006 als Werkzeug für die Genotypisierung von *E. multilocularis* vorgeschlagen worden war, folgten zahlreiche Studien (Casulli *et al.*, 2009; Casulli *et al.*, 2010; Knapp *et al.*, 2007; Knapp *et al.*, 2010; Knapp *et al.*, 2012), in denen unter anderem das Ziel verfolgt wurde, die räumliche Verbreitung des Parasiten auch unter Nutzung der Genotypisierung zu untersuchen. Solche Studien untersuchten die genetischen Beziehungen und mögliche gemeinsame Ursprünge von Parasitenisolaten aus einem begrenzten lokalen Areal (Umhang *et al.*, 2016), aber auch solche aus größeren geografischen Räumen (Casulli *et al.*, 2009; Casulli *et al.*, 2010; Knapp *et al.*, 2009; Knapp *et al.*, 2010; Knapp *et al.*, 2012), bis hin zu Proben, die weltweit gewonnen worden waren. Die Anzahl der ermittelten Profile bzw. Genotypen stieg von 25 (Bart *et al.*, 2006) in der ersten Veröffentlichung 2006 bis auf 32 Profile im Jahre 2009 (Knapp *et al.*, 2009) an. Anhand der *In-silico*-PCR Ergebnisse von Valot *et al.* (2015) (Valot *et al.*, 2015) kann darauf geschlossen werden, dass insgesamt maximal 39 verschiedene Profile des Mikrosatellitenmarkers EmsB existieren.

Die uneinheitliche Bezeichnung der Genotypen bzw. Profile erschweren die Vergleichbarkeit der Daten. Knapp und Kollegen (2007) beschrieben 29 Genotypen (Knapp *et al.*, 2007), welche den Profilen gleichgesetzt werden können. Dabei wurden die Elektropherogramme mit der Bezeichnung D bis H als Hauptprofile bezeichnet, welche auch überwiegend in Europa vorkommen. Die Bezeichnung der Profile D bis H

wurde von Casulli *et al.* (2010) (Casulli *et al.*, 2010) und Davidson *et al.* (2012) (Davidson *et al.*, 2012) übernommen.

Knapp und Kollegen (2009) setzten dann EmsB-Profile den Clustern (G 1-32) gleich (Knapp *et al.*, 2009).

Es folgten weitere Studien, in denen der EmsB-Marker zur Typisierung eingesetzt und eine andere Bezeichnungen der Genotypen eingeführt wurde (Casulli *et al.*, 2009; Knapp *et al.*, 2008; Umhang *et al.*, 2014), sodass die Daten schwer zu vergleichen sind.

### 6.2.1 Visuelle Auswertung

Um die Vergleichbarkeit der publizierten Daten mit den in dieser Arbeit beschriebenen Daten der EmsB-Mikrosatellitenanalyse zu gewährleisten, wurde eine visuelle Auswertung der erhaltenen EmsB-Profile anhand der Profilbeschreibungen in der Publikation von Knapp und Kollegen (Knapp *et al.*, 2007) vorgenommen. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die Einteilung der Profile A bis H (Knapp *et al.*, 2007) und deren Bezeichnung übernommen.

Knapp und Kollegen beschrieben fünf Hauptprofile (Profil D - H) für Europa (Knapp *et al.*, 2007). Mittels visueller Auswertung wurden vier Profile für die untersuchten Proben aus Brandenburg und Nordrhein-Westfalen identifiziert. Die Profile D und G wurden dabei am häufigsten gefunden. Das Profil E konnte nur bei einer einzigen *E. multilocularis*-Sequenz nachgewiesen werden. Das Profil H konnte bei insgesamt 38 Wurmisolaten identifiziert werden.

Bei dem Vergleich der Ergebnisse sind die unterschiedlichen Probenanzahlen zu beachten. In der vorliegenden Arbeit wurde das EmsB-Mikrosatellitenprofil für 490 von insgesamt 505 *E. multilocularis*-Exemplaren bestimmt. Im Vergleich dazu wurden bei einer Studie in Ungarn 81 Wurmisolate untersucht (Casulli *et al.*, 2010). Die Untersuchungen zeigten, dass das Profil H mit einem prozentualen Anteil von 55,5 % das in Ungarn am häufigsten vorkommende Profil war (Casulli *et al.*, 2010). Das Profil H unterscheidet sich auch statistisch signifikant von allen anderen Profilen (statistische Prüfung im Fisher-Exakt-Test in der vorliegenden Arbeit). Die Profilanteile der Profile G, E und D unterscheiden sich dagegen nicht statistisch signifikant in Ungarn. In der vorliegenden Arbeit wurde das Profil G mit einem Anteil von 50,9 % gefunden und stellte somit das im Untersuchungsraum am häufigsten vorkommende Profil dar. Alle

## Diskussion

---

Profilanteile der Proben aus Brandenburg unterschieden sich statistisch signifikant voneinander (Tabelle 9). Um eine Assoziation zwischen dem Profilanteil und der Herkunft der Proben sicher zu bestätigen, sind weitere Studien mit entsprechend großem Probenumfang nötig.

Eine Unterteilung in weitere Genotypen anhand der von Knapp *et al.* beschriebenen Methoden (Knapp *et al.*, 2007) wurde probeweise durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Trotz der großen Probenzahl konnten keine eindeutigen Ergebnisse und Unterteilungen erzielt werden, weil die EmsB-Mikrosatellitenanalyse mit der großen Anzahl an Proben im Vergleich zum untersuchten geografischen Raum zu einer Überdiskriminierung geführt hätte. Dies könnte auf eine Hyperdispersion des Markers in der Population hinweisen. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit andere Gruppierungsmethoden verwendet, welche in den folgenden Kapiteln erörtert werden. Zudem wurden auf Grund dieser Ergebnisse die Bezeichnung Genotypen für die Bezeichnung der Profile verwendet, welche nach Knapp und Kollegen den Clustern entsprechen (Knapp *et al.*, 2007).

Anhand der visuellen Auswertung der EmsB-Profile konnten Unterschiede zwischen Wurmisolaten festgestellt werden, die jeweils von einem einzelnen Fuchs gewonnen worden waren. Insgesamt 14 Füchse (13,9 %) waren mit Parasiten infiziert, welche sich bei der Eingruppierung nach den EmsB-Marker-Profilen mindestens zwei Profilen zuordnen ließen. Daraus kann geschlossen werden, dass im Untersuchungsraum Mischinfektionen mit *E. multilocularis* unterschiedlicher Genotypen bei Füchsen vorkamen. Diese Ergebnisse stimmen mit den Befunden anderer Studien (Knapp *et al.*, 2008; Umhang *et al.*, 2014) überein.

Weiterhin zeigte sich im Vergleich der Ergebnisse der mitochondrialen Marker mit den Ergebnissen der Mikrosatellitenanalyse, dass die Mischinfektionen, welche mit dem *cox1*-Marker nachgewiesen wurden, mit den Ergebnissen übereinstimmten, welche mit Hilfe des EmsB-Profils ermittelt wurden. Ergebnisse mit den anderen mitochondrialen Markern *nd1* und *atp6* deckten sich nicht mit den Resultaten der EmsB-Analyse. Auch Knapp und Kollegen konnten in ihrer Studie 2008 keinen Unterschied im EmsB-Profil von *E. multilocularis*-Isolaten nachweisen, welche einen SNP im *atp6*-Gen aufwiesen (Knapp *et al.*, 2008). Yanagida und Kollegen verwendeten in ihrer 2017 veröffentlichten Studie (Yanagida *et al.*, 2017) ebenfalls das *cox1* Gen als mitochondrialen Marker sowie zwei nukleare Marker für ihre Untersuchungen von *E. canadensis*. In dieser Studie zeigte sich auch zum Teil eine fehlende Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der nuklearen und der mitochondrialen Marker. Hieraus ergibt sich, dass nicht jede Kombination



nuklearer und mitochondrialer Marker eine eindeutige Differenzierung ermöglicht. In der vorliegenden Arbeit erwies sich die Kombination aus *cox1* und EmsB als diejenige, die am ehesten für eine Differenzierung geeignet sein könnte. Es ist jedoch zu beachten, dass die EmsB-Profile nicht eindeutig für die Isolate standen. So konnte einerseits in einigen Isolaten z. B. das Profil D detektiert werden, aber im *cox1* Gen war kein SNP nachweisbar. Andererseits konnten teilweise Mischinfektionen mit Hilfe des EmsB-Markers identifiziert werden, wohingegen sich die *cox1*-Sequenzen der Parasiten nicht unterschieden. Dennoch ergibt sich ein weiteres Indiz für die Zusammengehörigkeit der Analyse der beiden Marker *cox1* und EmsB aus dem Vergleich der Daten der Füchse Fu/2009/1607 und Fu/2011/1869. Dort korreliert der Unterschied im SNP mit dem Unterschied im EmsB-Profil im Fuchs Fu/2009/1607 (Profil H) mit den EmsB-Ergebnissen, die für die Wurmisolate des Fuchses Fu/2011/1869 detektiert wurden (ebenfalls Profil H). Dadurch wird die Vermutung bestätigt, dass sich beide Füchse mit dem gleichen Parasitengenotyp infiziert hatten.

### 6.2.2 Gruppierung der Mikrosatelliten mittels Kohonennetzen

In der Kohonenanalyse wird einem sich selbst organisierenden Netzwerk ein Datensatz zu Grunde gelegt, an dem das Netzwerk trainiert wird und dadurch selber Muster erkennt (Everitte *et al.*, 2011). Anschließend werden dann die Einzeldaten den jeweiligen Gruppen zugeordnet (Everitte *et al.*, 2011).

Für die in dieser Arbeit durchgeführte Kohonenanalyse mittels xyf-Funktion (Wehrens *et al.*, 2007) wurde das System mit den numerischen Daten der ermittelten Profile aus Deutschland sowie den Daten der untersuchten Referenzproben aus der Schweiz als ein Datensatz trainiert und die erwartete Gruppenanzahl vorgegeben. Der Datensatz bestand somit zum überwiegenden Teil aus Daten von Proben aus Deutschland. Dadurch lässt sich auch die eindeutigere Zuordnung der Profile von Proben aus Deutschland erklären. Weiterhin wurde bei den folgenden Analysen das Profil E nicht verwendet, da es nur einmal in Nordrhein-Westfalen nachgewiesen worden war und eventuell die Kohonenanalyse gestört hätte. Eine weitere Erklärung dafür, dass die Referenzproben aus der Schweiz primär in einer Gruppe clusterten, könnte die Probenqualität sein. Alle Proben aus Brandenburg und Nordrhein-Westfalen wurden für diese vorliegende Arbeit frisch aus gefrorenen Schleimhautproben isoliert, extrahiert und analysiert. Die Referenzproben hingegen waren DNA-Proben, welche schon vor längerer Zeit extrahiert und anschließend gelagert worden waren.

## Diskussion

---

Insgesamt kann die Kohonennetzwerk-Analyse als unabhängiger Prüfer angesehen werden, welcher die visuelle Auswertung, als vereinfachte Methode zur Auswertung des EmsB-Mikrosatellitenmarkers, und die damit ermittelten EmsB-Profile bestätigt.

Die Verwendung eines Kohonennetzes, auch Kohonenkarte genannt (Kohonen, 2001), findet in verschiedenen Fachgebieten ihre Anwendung (Kohonen, 2013; Pacella *et al.*, 2016; Wehrens *et al.*, 2007). Die sich selbst organisierenden Netzwerke oder Karten werden in der Biologie für die Analyse von DNA-Mikroarray-Daten, Genexpressionsmustern (Törönen *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2002) oder Sequenzen (Iwasaki *et al.*, 2013) verwendet. Mit dieser Methode konnte beispielsweise auch eine Serotypisierung natürlich mit *Toxoplasma gondii* infizierter Katzen vorgenommen werden (Maksimov *et al.*, 2013). Analysen mittels Kohonennetzwerk finden Anwendung bei großen Datensätzen, wie sie durch Sequenzierungen und Mikroarrayanalysen erzeugt werden (Törönen *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2002). Durch die Analyse der *E. multilocularis*-Proben von Füchsen aus Brandenburg und Nordrhein-Westfalen mit Hilfe des EmsB-Mikrosatelliten stand ein ausreichend großer Datensatz zur Verfügung. Dieser Datensatz sollte genutzt werden, um die Auswertung von Typisierungsdaten, die mit Hilfe des EmsB-Mikrosatelliten erzeugt worden waren, zu vereinfachen und um die bestehenden Gruppierungen in Form von Profilen zur Definition von Genotypen zu validieren.

Anhand der Kohonenanalysen konnten die visuell ermittelten Profile D, G und H für die in dieser Arbeit untersuchten Proben bestätigt werden. Es zeigte sich jedoch, dass bei Proben, die visuell keinem Profil eindeutig zugeordnet werden konnten, dies auch mit Hilfe des Kohonennetzwerks nicht gelang. Ein Teil der Proben, die visuell nicht zugeordnet werden konnten, clusterte mit dem Profil H (Abbildung 16). Dies liegt vermutlich an der kurzen Abfolge an Peaks, durch die das Profil H gekennzeichnet ist. Bei Proben, die nicht visuell zuzuordnen waren, zeigte sich oft ebenfalls ein Muster aus wenigen Peaks, die sich aber visuell eindeutig vom Profil H unterscheiden ließen. Hieraus kann geschlossen werden, dass diese Proben dem Profil H vermutlich fälschlicherweise zugeordnet wurden. Des Weiteren clusterte ein großer Teil der visuell nicht auswertbaren Proben mit dem Profil G. Dies liegt vermutlich daran, dass das Profil G im Gegensatz zu den anderen Profilen eine markant hohe Anzahl von 16 Peaks besitzt. Die visuell nicht auswertbaren Profile, welche in die Gruppe des Profils G clusterten, wiesen teilweise ebenfalls eine hohe Anzahl von Peaks auf. Die Peakhöhen und Abfolgen unterschieden sich jedoch visuell deutlich vom Profil G. Somit wurden diese Proben vermutlich ebenfalls falsch zugeordnet. Hieraus ergibt sich, dass

## Diskussion

---

vermutlich aufgrund von schlechter DNA-Qualität manche Proben nicht durch die Mikrosatellitenanalyse genotypisiert werden können.

In der Kohonenanalyse mit der Annahme von vier Gruppen und den Referenzproben aus der Schweiz (Abbildung 13) clusterte ein kleiner Teil der Proben des Referenzprofils G mit den Proben aus der vorliegenden Arbeit, die visuell dem Profil G zugeordnet worden waren. Dieser Befund stimmt mit den Ergebnissen von Knapp und Kollegen überein (Knapp *et al.*, 2007) und bestätigt somit das Profil G für die Proben aus Brandenburg und Nordrhein-Westfalen.

Alle Proben mit dem visuell ermittelten Profil H konnten mit der Kohonenanalysemethode ebenso wie die Referenzproben des Profils H einer einzigen Gruppe zugeordnet werden. Ein Grund dafür könnte sein, dass das Profil H eine markant niedrige Anzahl an Peaks im Vergleich zu den anderen verwendeten Profilen besitzt. Dadurch lässt es sich leichter von anderen Profilen abgrenzen und zusammen mit Proben gruppieren, die ein ähnliches Profil aufweisen. Durch dieses Ergebnis konnte auch das Profil H für die Proben aus Brandenburg und Nordrhein-Westfalen bestätigt werden.

Auffällig war, dass in den Analysen mit der Annahme von vier Gruppen und den Referenzproben aus der Schweiz ein großer Teil der Referenzproben aus der Schweiz immer in einer Gruppe clusterten. Dies könnte auf eine geografische Assoziation hindeuten. Knapp und Kollegen beschrieben in ihren Publikationen ebenfalls Genotypen, welche zu einem übergeordneten Profil gehörten (Cluster), sich aber im Detail unterschieden (Knapp *et al.*, 2007) und unterschiedlichen geografischen Regionen zugeordnet waren. Für das Profil G fanden Knapp *et al.* 6 Genotypen (Knapp *et al.*, 2007). Dabei ist zu beachten, dass Proben aus verschiedenen Regionen für diese Studie verwendet wurden, so dass Genotypen, welche auf Grund ihrer geografischen Herkunft in ein übergeordnetes Profil gruppiert werden, in diesem Fall dem Profil G zugeordnet werden. So enthält die Gruppe des Profils G in der Arbeit von Knapp *et al.* Proben aus der Schweiz, Deutschland und der Tschechischen Republik (Knapp *et al.*, 2007). Auf Grund der Ergebnisse, die in der vorliegenden Arbeit für die Proben aus Brandenburg und Nordrhein-Westfalen erzielt wurden und auf eine Hyperdispersion des Markers in der Population hinweisen, wurde für Profile der Begriff Genotypen genutzt, da eine weitere Unterteilung der Profile nicht möglich war. Weiterhin lässt sich aus der Analyse mit der Annahme von vier Gruppen unter Einbezug der Referenzproben aus der Schweiz darauf schließen, dass die Stichprobenzahl und deren Verteilung bei der Kohonenanalyse einen Einfluss haben kann.

### 6.2.3 Gruppierung mittels Sammons nicht-linearer Kartierung mit k-mean-Clustering

Die Gruppierung mittels Sammons nicht-linearer Kartierung mit k-mean-Clustering wurde genutzt, um die bei der Matrix-unterstützten Laser-Desorption/Ionisierung-Flugzeit-Massenspektrometrie (matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)) entstehenden Spektren zu identifizieren, zu vergleichen und Gruppen zuzuordnen (Karas *et al.*, 1991; Singhal *et al.*, 2015). Die MALDI-TOF MS wird zur Analyse von großen Molekülen wie zum Beispiel Proteinen verwendet und wird unter anderem in der Mikrobiologie eingesetzt, um Bakterien zu identifizieren und zu typisieren (Singhal *et al.*, 2015). Bei der Identifizierung von Bakterien mittels MALDI-TOF MS werden Spektren erzeugt, welche auch als Peptidmasse Fingerabdruck (PMF) bezeichnet werden (Karger, 2016; Karger *et al.*, 2012; Singhal *et al.*, 2015). Zur Identifizierung des untersuchten Proteins werden die erhaltenen Spektren mit bereits bekannten Spektren verglichen. Diese Spektren setzen sich zum Teil ähnlich komplex aus einer Vielzahl von Peaks zusammen wie die Muster, die man bei der Analyse der EmsB-Profil erhält. Aus diesem Grund wurde die Methode der k-means Clusteranalyse in Verbindung mit der Sammons nicht-linearen Kartierung (Karger *et al.*, 2011) auf die Ergebnisse der EmsB Profile der vorliegenden Arbeit angewendet. Die Methode erwies sich als geeignet für die Auswertung der Profile.

Die Gruppierung mittels Sammons nicht-linearer Kartierung mit k-mean-clustering ergab drei Cluster, denen die Proben mit den Profilen H, G und D zugeordnet werden konnten. Somit wurde die Zuordnung dieser Profile für die Proben aus Brandenburg und Nordrhein-Westfalen bestätigt.

Wie in Abbildung 17 zu sehen ist, konnte das Profil D (blaue Punkte) im zweidimensionalen Raum von den anderen Profilen getrennt werden. Auch das Profil H (rote Punkte) lag in einer separaten Punktwolke. Das dritte Cluster (grüne Punkte) beinhaltete Proben, die visuell dem Profil G zugeordnet wurden. Proben, die visuell keinem Profil zugeordnet werden, wurden ebenfalls diesem Cluster zugewiesen. Die Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen der Kohonennetzwerk-Analyse unter der Annahme der Existenz von drei Gruppen überein (Abbildung 16). Auch bei der Kohonenanalyse fielen Proben, die sich keinem Profil eindeutig zuordnen ließen, in die Gruppe mit den Proben des Profils G. Aber auch diese Proben konnten via visueller Auswertung eindeutig vom Profil G unterschieden werden, so dass diese als falsch zugeordnete Proben zu bezeichnen sind.

Keine der beiden zusätzlichen Methoden (Kohonenanalyse und Gruppierung mittels Sammons nicht-linearer Kartierung mit k-mean-Clustering) konnten Proben, denen visuell kein Profil zugeordnet werden konnte, einem Profil zuordnen. Dies liegt vermutlich an der schlechten Qualität der Proben.

In künftigen Studien sollten die beiden Methoden zur Auswertung der EmsB-Profile anhand weiterer Datensätze überprüft werden (z. B. mit Proben, die aus verschiedenen geografischen Regionen stammen), um die Methoden weiter zu validieren.

Eine Möglichkeit dazu könnte die neue EmsB-Datenbank, EWET-DB genannt, von Knapp und Kollegen (Knapp *et al.*, 2017) bieten, in der zurzeit EmsB-Daten von Isolaten aus 16 Ländern hinterlegt sind. Grundsätzlich könnten diese Isolate mit den in der vorliegenden Dissertation beschriebenen Methoden ausgewertet werden.

### 6.3 Phylogenie

#### 6.3.1 Phylogenetische Zuordnung anhand von Nukleotidsequenzen

Phylogenetische Untersuchungen anhand mitochondrialer Marker wurden für *E. multilocularis* mit Beginn der Arbeiten von Bowles 1992 durchgeführt (Bowles *et al.*, 1992; Knapp *et al.*, 2015; Lymbery, 2017; Nakao *et al.*, 2013; Nakao *et al.*, 2007). Es folgten weitere Studien, die die Verwandtschaftsverhältnisse zu *E. granulosus* und anderen *Echinococcus*-Arten aufklären sollten. Für diese Studien wurden sowohl mitochondriale Marker als auch nukleare Marker genutzt (Nakao *et al.*, 2013; Nakao *et al.*, 2007; Saarma *et al.*, 2009). Bis heute ist jedoch noch nicht eindeutig aufgeklärt, ob sich *E. multilocularis* generell von *E. granulosus* unterscheidet oder ob beide zu einer paraphyletischen Gruppe gehören (Knapp *et al.*, 2015; Nakao *et al.*, 2013; Saarma *et al.*, 2009). Weiterhin wurde besonders in den letzten zehn Jahren die genetische Vielfalt innerhalb von *E. multilocularis* in Bezug auf das Vorhandensein von geografischen Mustern untersucht. So konnten Nakao und Kollegen 2009 in ihrer Studie insgesamt 18 Haplotypen von *E. multilocularis* für Proben aus Europa, Asien und Nordamerika nachweisen (Nakao *et al.*, 2009). Dagegen beschreibt McManus *E. multilocularis* trotz der nachgewiesenen geografischen Variationen als genetisch homogen und bezeichnet diese Variationen als Kladen (McManus, 2013). Dies spiegelt die anhaltende Diskussion wider, ab wann ein Polymorphismus ein festes Merkmal zur Unterscheidung von Arten ist oder nur eine genetische Varianz innerhalb einer Art beschreibt, welche keinen Einfluss auf die Phylogenie und Taxonomie hat.

## Diskussion

---

Zur Untersuchung der Phylogenie wurden in der vorliegenden Arbeit bekannte Nukleotidsequenzen aus der NCBI-Datenbank verwendet. Zur Einordnung der in dieser Arbeit gewonnenen Sequenzdaten in die allgemeine Phylogenie wurden die Sequenzen der Publikation von Nakao 2007 (Nakao *et al.*, 2007) verwendet. Es konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass alle ermittelten Sequenzen mit allen drei Markern eindeutig der Spezies *E. multilocularis* zuzuordnen waren. Die Bootstrapwerte waren allesamt gering. Diese geringen Wahrscheinlichkeiten finden sich auch bei Nakao *et al.*, 2007 (Nakao *et al.*, 2007).

Die genauen Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Gattung *Echinococcus* bleiben weiter unklar (Knapp *et al.*, 2015; Lymbery, 2017). So konnte bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen mittels *atp6* und *cox1*-Marker, *E. shiquicus* nicht als Schwestergruppe identifiziert werden (Abbildung 18 und Abbildung 19). Dies ist vergleichbar mit den Ergebnissen von Xiao und Kollegen (Xiao *et al.*, 2005). Ein Grund dafür könnte sein, dass nur jeweils ein Marker für die Analyse in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. Nakao und Kollegen verwendeten in ihrer Arbeit drei verschiedene Datensätze, zum einen das gesamte mitochondriale Genom ohne die nicht codierenden Regionen, zum anderen die 12 proteinkodierenden Gene ohne die dritte Codon-Position sowie die 12 Aminosäuresequenzen der mitochondrialen Proteine (Nakao *et al.*, 2007). Auch in der Studie von Nakao und Kollegen (2013) wurden die Sequenzen aller mitochondrialen Gene verwendet (Nakao *et al.*, 2013). Wurde die Analyse allein mit dem *nd1*-Marker durchgeführt, traten in der vorliegenden Arbeit *E. multilocularis* und *E. shiquicus* als Schwestergruppen in Erscheinung. Diese Ergebnisse, auch im Vergleich zu den bereits publizierten phylogenetischen Analysen, unterstützen die Hypothese, dass sowohl mehrere mitochondriale Marker als auch nukleare Marker gemeinsam für die Auflösung der phylogenetischen Verhältnisse genutzt werden sollten, um valide Aussagen treffen zu können.

Die Aufteilung von *E. orteppi* G5 und *E. canadensis* G6 bis G8 war in der vorliegenden Arbeit bei der einzelnen Verwendung der Marker für die Analyse der Phylogenie immer gleich (Abbildung 18, Abbildung 19, Abbildung 20) und auch vergleichbar zu den Ergebnissen aus der Literatur (Nakao *et al.*, 2013; Nakao *et al.*, 2007; Xiao *et al.*, 2005). Die zusätzlich verwendeten Sequenzen aus der vorliegenden Arbeit verursachten somit keine Verzerrung.

Bei dem Vergleich der publizierten Sequenzdaten des *cox1*-Markers fiel auf, dass der SNP an der Position 9528 bp (G zu T; Genposition 364 bp) ebenfalls in einer Probe aus

## Diskussion

---

Österreich (AB461412) beschrieben worden war (Nakao *et al.*, 2009). Dies spiegelt sich auch im Dendrogramm (Abbildung 22) wider. Ein weiterer SNP an der Position 9510 bp (Genposition 346 bp) in dem Isolat aus Österreich konnte in keiner der in dieser Arbeit untersuchten Proben nachgewiesen werden. Ob dieser Befund einen gemeinsamen Ursprung der Parasiten vermuten lassen kann, erscheint eher zweifelhaft. Näheren Aufschluss könnten Untersuchungen weiterer Marker oder letztlich die Vollgenomsequenzierung bringen.

Der SNP an der Position 9625 bp (C zu T), welcher bei Wurmisolaten des Fuchses Fu/2012/1527 detektiert werden konnte, wurde schon einmal für eine Probe aus China (JF906153) mit dem Haplotypen H17 beschrieben (Ma *et al.*, 2012). Jedoch weist die Sequenz aus China nicht die Sequenzunterschiede an den Positionen 9839 bp (T zu G) (Genposition 675 bp) (Nakao *et al.*, 2009) und 9986 bp (G zu A) (Genposition 822 bp) auf, welche Proben aus Europa charakterisieren (Ito *et al.*, 2010; Nakao *et al.*, 2009). Auch die Proben aus Brandenburg und Nordrhein-Westfalen zeigen diese für Europa charakteristischen Sequenzunterschiede im Vergleich zu Sequenzen aus Asien oder Nordamerika. Somit sind die in dieser Arbeit untersuchten Proben erwartungsgemäß näher mit anderen Proben aus Europa verwandt und der SNP an der Position 9625 bp weist auf eine Homoplasie hin.

Dies wird auch im Dendrogramm deutlich (Abbildung 22), in dem ein Hauptcluster zu erkennen ist, dass die beiden Haplotypen Asien und Europa (Konyaev *et al.*, 2013) jeweils als Gruppe voneinander getrennt beinhaltet. Die Proben aus der vorliegenden Arbeit clusterten im Hauptcluster der Proben aus Europa. Der Nukleotidaustausch an der Position 10146 (C zu T) (Genposition 982), welcher in einem Wurmisolat aus Fuchs Fu/2011/420 in Brandenburg, Deutschland, detektiert wurde, wurde auch in einem Isolat aus Russland (RUS13 AB777916) (Konyaev *et al.*, 2013) und einem Isolat aus Kanada (BC1, KC550004 (Geszy *et al.*, 2013) nachgewiesen. Das Isolat aus Kanada ist den Isolaten aus Europa sehr ähnlich, darum clustert es auch mit anderen Proben aus dieser Studie und mit publizierten Sequenzdaten von europäischen Isolaten in einer Untergruppe, wie in Abbildung 22 zu erkennen ist. Ein sicheres Verwandtschaftsverhältnis bzw. Rückschlüsse auf einen gemeinsamen Vorfahren auf der Basis nur eines Markers zu ziehen, ist jedoch zweifelhaft.

Des Weiteren weist das Isolat RUS13 (Konyaev *et al.*, 2013) nicht die oben beschriebenen Sequenzunterschiede auf, welche Proben aus Europa charakterisieren. Aus diesem Grund clustert es in einer anderen Gruppe mit Proben aus Russland und

## Diskussion

---

Nordamerika. Daher lässt sich vermuten, dass der SNP, welcher auch in einem Wurmisolat aus dem Fuchs Fu/2011/420 in Brandenburg, Deutschland, detektiert wurde, parallel entstanden ist und nicht auf einen gemeinsamen Vorfahren schließen lässt. In dieser Gruppe, welche den nordamerikanischen Haplotyp (Ito *et al.*, 2010; Konyaev *et al.*, 2013; Nakao *et al.*, 2009) beschreibt, spaltet sich eine Untergruppe ab, die drei Isolate aus den USA (Nakao *et al.*, 2009; Yamasaki *et al.*, 2008) umfasst (Abbildung 22). Diese drei Isolate besitzen die von Bowles und Kollegen beschriebenen SNPs (A zu G an der Position 9924 / Genposition 759) und C zu T an der Position 9964 / Genposition 799), welche den Genotypen M2 (Europa) definieren (Bowles *et al.*, 1992). Nakao *et al.* sowie Yamasaki *et al.* ordneten diese Isolate dem Haplotypen Nordamerika zu (Nakao *et al.*, 2009; Yamasaki *et al.*, 2008).

Zu beachten ist, dass Bowles und Kollegen für ihre Untersuchungen jeweils nur ein *E. multilocularis*-Isolat aus China, Nordamerika, Alaska und Europa verwendet haben (Bowles *et al.*, 1992). Keine der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Sequenzen konnte dem M2 Genotyp zugeordnet werden, sondern alle waren, bis auf die beschriebenen SNPs für die einzelnen Isolate und den G zu A-Austausch an der Position 9986 bp (Genposition 822), identisch mit dem Genotyp M1. Aus diesem Grund sollten die SNPs an den Positionen 9839 bp (T zu G) und 9986 bp (G zu A) als Unterscheidungsmerkmal genutzt werden und nicht die von Bowles und Kollegen beschriebenen Positionen. Diese SNPs charakterisieren auch einen Genotyp, welcher Proben aus Europa eigen zu sein scheint. Das Isolat RUS16 (Konyaev *et al.*, 2013) befindet sich ebenfalls in derselben Gruppe wie die Isolate, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, sowie weitere Isolate aus Europa (Nakao *et al.*, 2009) und zwei Isolate aus Kanada (Geszy *et al.*, 2013; Geszy *et al.*, 2015). Das stimmt mit den Ergebnissen von Konyaev *et al.* (Konyaev *et al.*, 2013) und Geszy *et al.* (Geszy *et al.*, 2013; Geszy *et al.*, 2015) überein, dass diese Proben zum europäischen Genotyp zählen. Um sicherzustellen, dass es sich bei dem beschriebenen Isolat aus Kanada um einen Eintrag des Haplotypen aus Europa handelt und auszuschließen, dass dieser Haplotyp über einen längeren Zeitraum in Kanada etabliert war, sollte dies mit einer Kombination aus mitochondrialen und nuklearen Markern oder einer Vollgenomsequenzierung aufgelöst werden.

Insgesamt sind die Sequenzen der Isolate, die hinsichtlich des *cox1*-Markers untersucht wurden, bis auf wenige SNPs sehr homogen. Die Ähnlichkeit könnte auf ein Verwandtschaftsverhältnis hinweisen. Die Unterschiede, welche durch die SNPs detektiert wurden, können ebenfalls auf Verwandtschaftsverhältnisse hindeuten, jedoch



## Diskussion

---

können Homoplasien auch nicht ausgeschlossen werden. Außerdem sind auch bei dieser phylogenetischen Analyse die geringen Bootstrap-Werte zu beachten, welche ein Maß für die Wahrscheinlichkeit der Knoten darstellen. Die geringen Bootstrap-Werte lassen somit auch auf eine geringe Wahrscheinlichkeit der phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse schließen und zeigen somit, dass die Verwendung eines einzelnen Markers nur eine geringere Aussagekraft hat. Daraus ergibt sich, dass eine Kombination von mehreren Markern, anderen Markern oder die Vollgenomsequenzierung für die Analyse der Verwandtschaftsverhältnisse genutzt werden sollte.

Sequenzdaten für das *nd1*-Gen von *E. multilocularis*-Isolaten, welche in der Gendatenbank hinterlegt waren, wurden für den Vergleich mit den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Sequenzinformationen genutzt. Dabei konnten die ermittelten SNPs in keiner der veröffentlichten Sequenzen wiedergefunden werden. Die Konsenssequenz aus den ermittelten Sequenzen aller Wurmisolate aus Brandenburg und Nordrhein-Westfalen ist für den untersuchten Genabschnitt identisch mit Isolaten aus Polen (AJ132907-AJ132910) (Kedra *et al.*, 2000), (JX266825, JX266826) (Dybicz), Estland (AY855918) (Moks *et al.*, 2005), China (AY389984) (Yang *et al.*) und Kanada (KC848475-77) (Schurer *et al.*, 2014). Diese Isolate sowie die beiden Isolate aus Brandenburg, welche sich nur durch die in dieser Arbeit beschriebenen SNPs von der Konsenssequenz unterscheiden, bilden eine gemeinsame Untergruppe. Diese Untergruppe würde somit einen Europäisch-Asiatischen-Genotyp beschreiben. Auf Grund des kurzen Genfragments, welches für diese Analyse verwendet wurde, ist diese Gruppierung jedoch kritisch zu bewerten. Das Ergebnis unterstützt jedoch die These von Jenkins *et al.* und Gesy *et al.* (Gesy *et al.*, 2013; Jenkins *et al.*, 2012), dass „europäische“ Genotypen in Kanada vorkommen. Wie für die Ergebnisse des *cox1*-Gens beschrieben, sollte dies jedoch mit zusätzlichen Markern noch einmal überprüft werden. Die Autoren Yang und Kollegen haben das Isolat aus China (AY389984) als M1 klassifiziert (Yang *et al.*), da diese Sequenz mit der von Bowles und McManus 1993 als M1 eingestuften Sequenz (AJ237639) (Bowles *et al.*, 1993b) bis auf eine Base an der Position 7722 bp (Genposition 231 bp) (C zu T) übereinstimmte. Der SNP an der Position 7722 bp wurde auch bei Proben aus dem Iran (Beiromvand *et al.*, 2011), China (EU704122-24) (Zhu *et al.*) und Hokkaido (Japan) (Nakao *et al.*, 2002) sowie bei beiden Genotypen (M1 und M2) (AJ237639, AJ237640) von Bowles und McManus (Bowles *et al.*, 1993b) nachgewiesen. Alle diese Sequenzen weisen an der Position 7722 bp ein C auf. Alle anderen für die hier vorliegende phylogenetische Analyse verwendeten

## Diskussion

---

Sequenzen, einschließlich der Proben aus Brandenburg und Nordrhein-Westfalen, besitzen an dieser Position ein T. Bis auf das Isolat M2 (AJ237640) (Bowles *et al.*, 1993b) bilden die Sequenzen, die von Parasiten aus dem Iran, aus China und Hokkaido (Japan) stammen, ein gemeinsames Cluster, in dem sich die oben beschriebene Untergruppe eines europäisch-asiatischen Genotyps eingliedert (Abbildung 23). Somit können die Proben, die in dieser Arbeit untersucht wurden, dem M1-Genotyp zugeordnet werden.

Die M2-Sequenz bildet ein eigenständiges Cluster. Ein weiteres Cluster wird ausschließlich von Proben aus Kanada (Schurer *et al.*, 2014) gebildet, das Isolate beinhaltet, welche die beiden SNPs an der Position 7856 bp (Genposition 365 bp) (C zu T) und an der Position 7981 bp (A zu G) (Genposition 490 bp) aufweisen. Die Unterscheidung zwischen M1 und M2 anhand des nd1-Markers wurde, wie schon 1992 von Bowles *et al.* für *cox1* gezeigt (Bowles *et al.*, 1992), nur anhand zweier SNPs an den Positionen 7856 bp (Genposition 365 bp) und 7987 bp (Genposition 496 bp) vorgenommen (Bowles *et al.*, 1993b).

Wie bereits die Ergebnisse für den *cox1*-Marker zeigten, konnten die Proben aus Brandenburg und Nordrhein-Westfalen auch anhand des nd1-Markers der Gruppe M1 zugeordnet werden, wenn die Aufteilung nach Bowles und McManus erfolgte (Bowles *et al.*, 1993b). Dies würde nach Bowles und McManus einem Genotyp entsprechen, welcher Proben aus China, Alaska und Nordamerika beschreibt (Bowles *et al.*, 1993b). Diese Gruppierung ist, wie bereits Haag und Kollegen bemerkten (Haag *et al.*, 1997), kritisch zu hinterfragen. Die Ergebnisse der phylogenetischen Untersuchung der vorliegenden Arbeit mittels des nd1-Markers deuten auf einen europäischen Genotypen/Haplotypen hin, welcher auch in Teilen Kanadas vorkommt (Geszy *et al.*, 2013; Jenkins *et al.*, 2012; Schurer *et al.*, 2014), ohne dass ein epidemiologischer Zusammenhang zwischen den Isolaten evident wäre. Es ist festzuhalten, dass eine genetische Variabilität der untersuchten Isolate, die über das erwartete Maß hinausging, auch in einem sehr begrenzten geografischen Bereich (Brandenburg) für *E. multilocularis* gefunden wurde. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Geszy und Kollegen für Isolate aus Kanada (Geszy *et al.*, 2014) überein, die eine größere genetische Variabilität des Parasiten mit Hilfe des nd1-Markers zeigten. Auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, dass eine geografische Differenzierung von *E. multilocularis*-Isolaten anhand nur weniger SNPs eines Markers nicht oder nicht immer möglich ist. Somit ist die nachgewiesene genetische Variabilität ein Hinweis auf Populationspolymorphismen, welche nicht notwendigerweise mit einer geografischen Skalierung in Verbindung

## Diskussion

---

gebracht werden kann. Auch die Kombination schon bekannter Marker bewirkt keine Verbesserung in der Aussagekraft über die geografische Differenzierung. Dies wiederum unterstützt die Notwendigkeit der Charakterisierung neuer Marker.

Weiterhin ist zu beachten, dass für die Untersuchung der Phylogenie mittels *nd1*-Marker in der vorliegenden Arbeit ein im Verhältnis zu den anderen beiden Markern (*atp6* 516 bp, entspricht der gesamten Gengröße (Nakao *et al.*, 2002), *cox1* 785 bp, gesamte Gengröße 1608 bp (Nakao *et al.*, 2002) kleines Sequenzfragment von nur 379 bp bei einer gesamten Gengröße von 894 bp (Nakao *et al.*, 2002) verwendet wurde. Dadurch kann nur ein kleiner Informationsbereich verglichen werden. Außerdem sind die Bootstrapwerte der einzelnen Klagen gering und damit auch die Wahrscheinlichkeit, dass die vorgenommene Aufteilung den tatsächlichen Verhältnissen entspricht.

Auch die in der vorliegenden Arbeit mittels des *atp6*-Markers nachgewiesenen SNPs der Proben aus Brandenburg und Nordrhein-Westfalen wurden mit publizierten Sequenzen verglichen. Dabei wurde festgestellt, dass keiner der gefundenen SNPs bisher in einer Publikation beschrieben ist. An der Position 5911 bp fanden Nakao *et al.* (2002) (Nakao *et al.*, 2002) in Proben aus Hokkaido, China und Alaska (Datenbankeinträge AB027552-AB027555), (Fukunaga *et al.*) ein C. Die Proben aus Europa, einschließlich der im Rahmen der vorliegenden Arbeit sequenzierten Proben, wiesen an dieser Position ein T auf und konnten dadurch von den Proben aus Asien und Alaska unterschieden werden. Bis auf die hier beschriebenen SNPs unterschieden sich diese Proben nicht von denen aus Rumänien (Snabel *et al.*), Deutschland und Österreich (Fukunaga *et al.*). Aus diesem Grund clusterten die Sequenzen alle in einer Gruppe (Abbildung 21). Obwohl wenige Sequenzen aus anderen Regionen verfügbar waren, konnten die untersuchten Proben anderen Proben aus Europa zugeordnet und auch mit Hilfe des *atp6*-Markers ein europäischer Haplotyp postuliert werden. Jedoch sind auch bei der Analyse mittels des *atp6*-Markers die niedrigen Bootstrapwerte zu beachten und somit auch eine geringere Wahrscheinlichkeit dafür, dass die vermuteten Verwandtschaftsverhältnisse tatsächlich so existieren.

Fasst man die Ergebnisse der phylogenetischen Untersuchungen aller drei Marker zusammen, kann festgestellt werden, dass die hier untersuchten Proben alle erwartungsgemäß der Art *E. multilocularis* und zwar deren europäischem Typ zuzuordnen sind. Weiterhin wurden in Proben aus Brandenburg und Nordrhein-Westfalen bisher weltweit noch nicht beschriebene SNPs nachgewiesen.

### 6.3.2 Phylogenetische Zuordnung anhand von Aminosäuresequenzen

Phylogenetische Untersuchungen auf Grundlage der Aminosäuresequenzen der drei mitochondrialen Marker zeigten ähnliche Verwandtschaftsverhältnisse im Vergleich zu den Untersuchungen auf, die mittels der Nukleotidsequenzen ermittelt worden waren. Auch bei diesen Analysen und der Bewertung der Phylogenie sind die geringen Bootstrapwerte zu berücksichtigen, sodass die postulierten Verwandtschaftsverhältnisse nur begrenzt als gestützt gelten können.

Bei den Untersuchungen anhand der AS-Sequenzen des *atp6*-Markers konnten die Sequenzen in zwei Hauptgruppen aufgeteilt werden, eine mit europäischen Proben und die Zweite mit Sequenzen aus China, Japan und Alaska. Nur drei der vier in dieser Arbeit gefundenen SNPs führten zu einem AS-Austausch. Dies hatte einen Einfluss auf die Unterteilung innerhalb der europäischen Proben (Abbildung 24). Die AS-Sequenzen waren bis auf die drei AS-Austausche identisch. Daher clusterten diese Proben zusammen und nur die Proben mit den AS-Austauschen wurden geringfügig separiert. Es konnte gezeigt werden, dass die untersuchten Proben zum europäischen Genotyp zählten.

Ferner wurden auch bei der phylogenetischen Analyse mittels *cox1*-Marker auf Basis der AS-Sequenzen zwei Kladen festgestellt (Abbildung 25). In der einen Klade clusterten Proben aus Kanada (Geszy *et al.*, 2015), den USA (Nakao *et al.*, 2009) und Russland (Konyaev *et al.*, 2013). Dies ist vergleichbar mit den Ergebnissen mittels Nukleotidsequenzen (Abbildung 22). Die Isolate zählen zum nordamerikanischen Haplotyp. In der zweiten Klade clusterten die ermittelten AS-Sequenzen zusammen mit Proben aus Russland (Konyaev *et al.*, 2012; Konyaev *et al.*, 2013), China (Nakao *et al.*, 2010; Nakao *et al.*, 2009), Österreich (Nakao *et al.*, 2009), Frankreich (Nakao *et al.*, 2009), der Mongolei (Ito *et al.*, 2010), Japan (Yamasaki *et al.*, 2008), der Slowakei (Nakao *et al.*, 2009) und Kanada (Geszy *et al.*, 2015). Auch bei dieser Analyse beruhen die Unterschiede nur auf wenigen AS-Austauschen. Aus diesem Grund sind die Unterteilungsmöglichkeiten gering und die Klade beschreibt einen europäisch-asiatischen Genotyp. Dieses Resultat stimmt mit den Ergebnissen der phylogenetischen Untersuchungen mittels der Nukleotidsequenzen des *cox1*-Markers überein.

Bei der phylogenetischen Analyse mittels AS-Sequenzen des NADH-Dehydrogenase-Untereinheit 1-Proteins kam es ebenfalls zu einer Auftrennung in zwei Kladen (Abbildung 26). Einer der beiden in dieser Arbeit beschriebenen SNPs hatte einen AS-Austausch zur Folge; dies ist jedoch der einzige Unterschied zu den Sequenzen aus der anderen

Klade. Die Aufteilung in zwei Kladen ist daher kritisch zu bewerten. Zum einen wurde nur ein kurzes AS-Sequenzstück für die Analyse verwendet und zum anderen sind die Sequenzen hochgradig homogen. Die Aufteilung der beiden Kladen fand somit ausschließlich anhand eines einzigen AS-Austausches statt. Es kam dabei zu einem Austausch von Alanin zu Valin, welcher für den Genotyp M2 nach Bowles *et al.* (Bowles *et al.*, 1993b) typisch ist. Somit wird die eine Klade durch den Genotyp M1 und die andere durch den Genotyp M2 nach Bowles *et al.* (Bowles *et al.*, 1993b) charakterisiert.

Anhand dieser Ergebnisse lassen sich *E. multilocularis*-Isolate also in zwei Gruppen aufteilen, wie bereits von Bowles und Kollegen postuliert wurde (Bowles *et al.*, 1992) (Bowles *et al.*, 1993b). In Anbetracht der Kürze des AS-Fragments, welches zur Analyse verwendet wurde, und der geringen Bootstrapwerte ist diese Unterteilung jedoch mit einer erheblichen Unsicherheit behaftet. Zudem sollte der geografische Ursprung der Proben mit in die Betrachtung einbezogen werden. Soweit auf diese Einteilung zurückgegriffen wird, ist es empfehlenswert, die Bezeichnung M2 konsequent für die oben genannte Gruppe zu verwenden die ein Valin statt Alanin in der AS-Sequenz besitzt und nicht zu postulieren, dass M2 als Vertreter für Proben aus Europa steht.

Insgesamt lässt sich auch aus den phylogenetischen Analysen mittels AS-Sequenzen schließen, dass es besser ist, mehrere Marker für die Untersuchungen zu verwenden. Auch sollten zusätzlich zu mitochondrialen Markern solche aus dem Kerngenom des Parasiten einbezogen werden, um die Phylogenie realitätsnäher abzubilden.

### 6.4 Räumliche Verteilung von Genotypen

Füchse sind als Endwirte von *E. multilocularis* maßgeblich an der Persistenz des Lebenszyklus im Untersuchungsgebiet und an der Verbreitung des Parasiten beteiligt. Sowohl durch das Migrieren des Fuchses (z. B. in der Dispersionsphase im Sommer/Herbst) als auch durch den Transport infizierter Tiere kann es zur Verbreitung des Parasiten kommen.

Die genetische Vielfalt, welche sowohl mit den mitochondrialen Markern als auch mit der Mikrosatellitenanalyse festgestellt wurde, und die Bildung von räumlichen Clustern deuten auf Endemiegebiete hin, welche vermutlich schon seit längerer Zeit bestehen. Im Bereich der Landkreise Ostprignitz-Ruppin und Prignitz stimmt diese Hypothese auch mit den Ergebnissen von Tackmann *et al.* (Tackmann *et al.*, 1998; Tackmann *et al.*, 2001)

## Diskussion

---

überein. Mittels des *atp6*-Markers konnten drei Füchse aus dem Landkreis Prignitz identifiziert werden, welche Wurmisolate mit demselben SNP aufwiesen (Abbildung 27).

Diese drei Füchse haben sich somit mit dem gleichen Genotyp von *E. multilocularis* infiziert, welcher in einem relativ engen geografischen Raum (Umkreis von 20 km) verbreitet war. Dieser mit einem mitochondrialen Marker ermittelte Genotyp beschreibt somit eine Parasitenpopulation innerhalb der *E. multilocularis*-Population von Brandenburg, die Rückschlüsse auf ein geografisches Gebiet ermöglichen. Es wäre wichtig, dieses Ergebnis mit geeigneten Markern aus dem Kerngenom von *E. multilocularis* zu überprüfen. Mit dem in dieser Arbeit verwendeten *EmsB*-Marker konnte es nicht bestätigt werden. Wie schon erwähnt, stimmt der Befund mit den Resultaten von Knapp und Kollegen überein, die ebenfalls keine Übereinstimmung zwischen Polymorphismen im *atp6*-Gen und dem *EmsB*-Profil fanden (Knapp *et al.*, 2008).

Bei einem ebenfalls im Landkreis Prignitz gestreckten Fuchs konnte bei allen fünf Wurmisolaten ein SNP in der *cox1*-Sequenz detektiert werden. Dieser SNP ist identisch mit dem SNP von einem der fünf Parasitenisolate des Fuchses Fu/2009/1607 aus dem Landkreis Havelland (Abbildung 27). Die beiden Füchse wurden in einer Distanz von 80 km gestreckt. Möglicherweise haben sich beide Füchse also mit dem gleichen Parasitengenotyp infiziert. Es ist daher anzunehmen, dass dieser Genotyp ein weiteres Verbreitungsgebiet besitzt. Diese Hypothese könnte jedoch nur durch eine engmaschige Beprobung in der Region überprüft werden.

Der Fuchs Fu/2009/1860, welcher mit Parasiten infiziert war, die sich sowohl im *atp6*- als auch im *nd1*-Marker von allen anderen Isolaten unterschieden, wurde im Landkreis Dahme-Spree gestreckt. In Brandenburg bestand somit im Zeitraum der Studie eine genetische Vielfalt bei hoch konservierten Genen. Eine weiterführende Untersuchung mittels Vollgenomsequenzierung von *E. multilocularis*-Isolaten könnte Aufschluss darüber geben, ob diese genetische Vielfalt einen Populationspolymorphismus widerspiegelt oder auf eine räumlich-epidemiologische Beziehung im Infektionsgeschehen schließen lässt. So beschrieben Tackmann und Kollegen in einer Studie 1998, dass endemische Foci für ein Gebiet kleiner als 400 km<sup>2</sup> zumindest vorübergehend stabil sein können (Tackmann *et al.*, 1998).

Es sollte in Betracht gezogen werden, die Genotypisierung von *E. multilocularis*-Isolaten grundsätzlich in die Routineuntersuchung aufzunehmen. Viele Prävalenzstudien beschreiben in ihren Methoden eine Bestätigung der Infektion mittels molekularer

## Diskussion

---

Methoden (Bagrade *et al.*, 2016; Hofer *et al.*, 2000). Häufig ist dies eine PCR nach Trachsel *et al.* (Trachsel *et al.*, 2007), gelegentlich mit anschließender Sequenzierung der Amplicons (Bagrade *et al.*, 2016). Das Genfragment, das durch die PCR generiert wird, ist jedoch zu klein, um die genetische Vielfalt innerhalb der Art *E. multilocularis* nachzuvollziehen, wenn die Größe des Genoms des Parasiten (115 Mbp) mit in den Blick genommen wird. Eine Alternative könnte darin bestehen, neue Methoden wie die Magnetic Capture-Methode mit bekannten Markern zu verbinden. Dies hätte mehrere Vorteile: Zum einen könnten mehr Proben untersucht werden, insbesondere auch Umweltproben (z. B. Kotproben von Füchsen) und zum anderen könnte auf schon vorliegende Daten zurückgegriffen werden. Allerdings ist durch die Verwendung einer Sonde die Größe des Fragments auch hier begrenzt. Insgesamt sollte eine Harmonisierung der Methoden angestrebt werden, die auch von Conraths und Deplazes empfohlen wird (Conraths *et al.*, 2015).

Grundsätzlich sollte eine einheitliche Bezeichnung der Genotypen angestrebt werden. Um die Zuordnung zu erleichtern, wurden in dieser Arbeit für die EmsB-Marker die Bezeichnungen H, G, E, D an die in den ursprünglichen Publikationen verwendeten Begriffe angepasst. Die Profile wurden dabei Genotypen gleichgesetzt, da eine Unterteilung der Profile in weitere Genotypen nicht möglich war. Nach Knapp *et al.* (2007) entsprechen diese Profile Clustern (Knapp *et al.*, 2007). Auch bei den mitochondrialen Markern wurden keine neuen Bezeichnungen für beschriebene Genotypen eingeführt, sondern die in der Literatur verwendeten Begriffe verwendet.

Eine Mischinfektion einzelner Füchse mit *E. multilocularis*-Parasiten verschiedener Genotypen wurde bei Proben aus Brandenburg und aus Nordrhein-Westfalen mittels EmsB-Mikrosatellitenanalyse sowie mit Hilfe der mitochondrialen Marker festgestellt. Auch Knapp *et al.* (Knapp *et al.*, 2009; Knapp *et al.*, 2008) und Nakao *et al.* (Nakao *et al.*, 2003) konnten Mischinfektionen nachweisen. Es ist zu betonen, dass vier von zehn untersuchten Füchsen aus Nordrhein-Westfalen eine Infektion mit Parasiten aufwiesen, die sich in mehr als einem EmsB-Profil unterschieden. In Brandenburg waren es 10 von 91 untersuchten Tieren. Im Vergleich dazu beschrieben Knapp *et al.* 2008 eine Mischinfektion bei 25 Füchsen (52%) aus Frankreich (Knapp *et al.*, 2008). Bei einer weiteren Studie von Knapp und Kollegen 2009 wurde eine Mischinfektion bei 44 (35%) von 125 untersuchten Füchsen aus Europa nachgewiesen (Knapp *et al.*, 2009).

Im Vergleich der Methoden, welche für die molekulare Typisierung von *E. multilocularis*-Isolaten aus Deutschland herangezogen wurden, erwies sich die Mikrosatellitenanalyse

## Diskussion

---

am ehesten als geeignet für eine geografische Analyse des relativ kleinen Untersuchungsgebietes, das im Wesentlichen aus dem Land Brandenburg bestand. Mit allen verwendeten Analysemethoden ließ sich das Vorkommen der drei Profile D, G und H bestätigen. Eine Kombination mit dem *cox1*-Marker ergab zudem eine Bestätigung der Mischinfektionen. Bei der räumlichen Analyse der EmsB-Profile in Brandenburg konnten darüber hinaus zwei geografisch lokalisierbare Gruppen mit verschiedenen EmsB-Profilen dargestellt werden. Eine der beiden Gruppen, welche durch das Profil G gekennzeichnet wird, liegt in dem bekannten *E. multilocularis*-Endemiegebiet der Landkreise Prignitz und Ostprignitz-Ruppin (Tackmann *et al.*, 1998). Die zweite Gruppe, gekennzeichnet durch das Profil D, erstreckt sich über Mittel- und Südbrandenburg. Es ist zu vermuten, dass die zweite Gruppe aus Sachsen-Anhalt nach Brandenburg gelangte. Dafür sprechen auch Erkenntnisse aus der Studie von Denzin *et al.* (Denzin *et al.*, 2014), in der eine Verschiebung des geografischen Zentrums von *E. multilocularis* um 3,4 km pro Jahr in Richtung Nord-Nordost gezeigt wurde. Um die Hypothese der Einwanderung des Parasiten aus Sachsen-Anhalt nach Brandenburg zu belegen, ist die Genotypisierung von Proben aus Sachsen-Anhalt notwendig.

Die Hypothese, dass sowohl Brandenburg als auch Nordrhein-Westfalen als langjährige Endemiegebiete angesehen werden können, wird auch durch die EmsB-Marker-Ergebnisse unterstützt, da vier Profile detektiert werden konnten. Vorstellbar ist auch, dass mehrere Genotypen separat Eingang in das Studiengebiet in Brandenburg fanden, aus denen sich die beiden jetzt nachweisbaren Cluster herausgebildet haben. Für die Hypothese einer Kernregion, von der aus sich der Parasit ausgebreitet hat (Davidson *et al.*, 2012), gab es in der hier betrachteten Studienregion keine näheren Hinweise.

Seit der Einführung des EmsB Mikrosatellitenmarkers zur Genotypisierung von *E. multilocularis* vor etwa 10 Jahren (Bart *et al.*, 2006) wurden zahlreiche Studien mit Hilfe dieses Markers durchgeführt (Casulli *et al.*, 2009; Casulli *et al.*, 2010; Enemark *et al.*, 2013; Knapp *et al.*, 2009; Knapp *et al.*, 2008; Knapp *et al.*, 2012; Umhang *et al.*, 2014; Umhang *et al.*, 2016). Insbesondere um die Vergleichbarkeit mit diesen Arbeiten herzustellen, wurde EmsB in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Dabei konnte festgestellt werden, dass die hier untersuchten Proben aus Brandenburg und Nordrhein-Westfalen zu den europäischen Profilen D, G H und E zählen. Andere nicht europäische Profile konnten in dieser Arbeit nicht detektiert werden. Im Kontext der geografischen Herkunft ist festzuhalten dass die gefundenen europäischen Profile sowohl in Isolaten aus Deutschland, wie in dieser Arbeit gezeigt, als auch in Isolaten aus



## Diskussion

---

an Deutschland angrenzenden Ländern nachgewiesen werden konnten. Weiterhin sind diese Profile jedoch auch in Isolaten detektiert wurden, die aus Gebieten stammen, die räumlich weit von der in dieser Arbeit untersuchten beprobten Region entfernt sind (Casulli *et al.*, 2010; Knapp *et al.*, 2007). So wurde das Profil H, welches in einem Teil der untersuchten Proben aus der vorliegenden Dissertation detektiert werden konnte, sowohl in Ungarn (Casulli *et al.*, 2010) und der Slowakei (Knapp *et al.*, 2007) als auch in Kanada (Jenkins *et al.*, 2012) nachgewiesen. Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurde postuliert, dass das Profil H Proben aus Europa charakterisiert. Ob es sich bei dem Isolat mit dem Profil H aus Kanada um einen Neueintrag handelt oder um eine schon länger endemische Population von *E. multilocularis*, welche bis dato unentdeckt geblieben war, ist nur mit weiterführenden Analysen vorzugsweise einer Vollgenomanalyse und weiteren Untersuchungen zu klären. Anhand der weit verbreiteten Profile in verschiedenen Regionen, welche große geografische Distanzen aufweisen, lässt sich mit Hilfe des EmsB-Marker ein europäisches Cluster beschreiben, das sich aus den Profilen D, E, G und H zusammensetzt. Allerdings können die Unterschiede in den Profilen nicht immer geografischen Regionen zugeordnet werden. Umhang und Kollegen (Umhang *et al.*, 2016) beschrieben mittels EmsB-Marker potentielle Infektketten in einem begrenzten Untersuchungsgebiet.

Insgesamt stützen sowohl diese teilweise zunächst widersprüchlich erscheinenden Resultate als auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Auffassung von Lymbery (Lymbery, 2017), dass genetische Variabilität bei *E. multilocularis* eher innerhalb der Population als zwischen lokalen Population auftritt und anscheinend nur über einen großen geografischen Bereich hinweg eine genetische Skalierung besteht.

Die mitochondrialen Marker erwiesen sich in der vorliegenden Arbeit als geeignet, die Echinokokkenspezies eindeutig zu definieren, jedoch ließen sie keine genaue Aufteilung der Verbreitung des Parasiten zu. Mittels EmsB-Marker konnten lokale geografische Cluster nachgewiesen werden, jedoch fanden sich Isolate mit demselben Genotyp auch in einem anderen weit entfernten Gebiet, wie z. B. in Ungarn (Casulli *et al.*, 2010), sodass fraglich ist, ob Isolate des gleichen Genotyps als Glieder in einer einzigen Infektkette angesehen werden können und wie sie gegebenenfalls dort einzuordnen sind. Möglicherweise muss die Einteilung der EmsB-Profile überarbeitet werden. Dabei könnte hilfreich sein, sichere Entscheidungspunkte für die Skalierung zu setzen, um einerseits lokale Unterschiede nachweisen zu können und andererseits auch globale Unterschiede darzustellen. Dabei sollte der Verwendungsbereich des Marker noch einmal kritisch bewertet werden. Eine neue Möglichkeit zum Vergleich lokaler und

## Diskussion

---

globaler Daten bietet die Datenbank EWET-DB, in die über eine Webseite EmsB-Daten eingepflegt und analysiert werden können (Knapp *et al.*, 2017). Es ist geplant, mit der Arbeitsgruppe weiterführende Untersuchungen durchzuführen, bei denen die Daten aus der vorliegenden Dissertation in die Datenbank integriert und analysiert werden sollen. Ziel dieser Untersuchungen sollte sein, die Daten aus Brandenburg in einen globalen Kontext zu bringen und dabei zu prüfen, ob es sich primär um Populationspolymorphismen bei *E. multilocularis* handelt oder ob andere Phänomene die Polymorphismen erklären können. Weiterhin könnten diese weiterführenden Untersuchungen dabei helfen die Entscheidungspunkte für die erforderliche Skalierung festzulegen, die Einteilung der EmsB-Profile - soweit nötig - anzupassen und den Verwendungszweck des EmsB-Marker zu definieren.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass mit den verwendeten Markern die These, (1) dass ein Fuchs aus einem begrenzten geografischen Raum verschiedene Genotypen in sich tragen kann, bestätigt werden konnte. Ebenfalls wurde gezeigt, (2) dass Genotypen in einem kleinen geografischen Raum unterschiedlich verbreitet sein können. (3) Die Proben aus Brandenburg und Nordrhein-Westfalen gehören zum europäischen Haplotyp von *E. multilocularis*. (4) Die vier verwendeten Marker sind zur Genotypisierung von Proben aus einem begrenzten endemischen Gebiet verwendbar, um Populationspolymorphismen aufzuzeigen. Die Verwendung der Marker einzeln als auch die Kombination mehrerer Marker lassen keine eindeutigen Rückschlüsse auf die phylogenetischen Verhältnisse als auch auf die räumlichen Beziehungen in einem globalen Umfeld zu. Es ist schwer, eine Kombination von Markern zu empfehlen, die stets zu einem befriedigenden Typisierungsergebnis führt.

In dieser Arbeit konnte mit Hilfe der Kombination des *cox1*- und des EmsB-Markers eine Mischinfektionen bei vier Füchsen bestätigt werden. Die Kombination von *atp6*- und *nd1*-Markern sprechen für das Vorhandensein eines Parasitengenotyps, jedoch wiesen die Isolate dieses Genotyps keine Anomalie im EmsB-Profil auf.

### Literaturverzeichnis

- Bagrade, G., Deksne, G., Ozoliņa, Z. *et al.* (2016). *Echinococcus multilocularis* in foxes and raccoon dogs: an increasing concern for Baltic countries. *Parasites & Vectors* **9**: 615.
- Barker, G.C. (2002). Microsatellite DNA: a tool for population genetic analysis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg* **96** (Suppl. 1): S21-S24.
- Bart, J.M., Knapp, J., Gottstein, B. *et al.* (2006). EmsB, a tandem repeated multi-loci microsatellite, new tool to investigate the genetic diversity of *Echinococcus multilocularis*. *Infect. Genet. Evol.* **6**(5): 390-400.
- Beiromvand, M., Akhlaghi, L., Massom, S.H.F. *et al.* (2011). Detection of *Echinococcus multilocularis* in Carnivores in Razavi Khorasan Province, Iran Using Mitochondrial DNA. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **5**(11): e1379.
- Böttcher, D., Bangoura, B., Schmaschke, R. *et al.* (2013). Diagnostics and epidemiology of alveolar echinococcosis in slaughtered pigs from large-scale husbandries in Germany. *Parasitol. Res.* **112**(2): 629-636.
- Boucher, J.M., Hanosset, R., Augot, D. *et al.* (2005). Detection of *Echinococcus multilocularis* in wild boars in France using PCR techniques against larval form. *Vet. Parasitol.* **129**(3-4): 259-266.
- Bowles, J., Blair, D., McManus, D.P. (1992). Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Mol. Biochem. Parasitol.* **54**(2): 165-173.
- Bowles, J., Blair, D., McManus, D.P. (1994). Molecular genetic characterization of the cervid strain ('northern form') of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* **109**( 2): 215-221.
- Bowles, J., McManus, D.P. (1993a). Molecular variation in *Echinococcus*. *Acta Trop.* **53**(3-4): 291-305.
- Bowles, J., McManus, D.P. (1993b). NADH dehydrogenase 1 gene sequences compared for species and strains of the genus *Echinococcus*. *Int. J. Parasitol.* **23**(7): 969-972.
- Bretagne, S., Assouline, B., Vidaud, D. *et al.* (1996). *Echinococcus multilocularis*: microsatellite polymorphism in U1 snRNA genes. *Exp. Parasitol.* **82**(3): 324-328.
- Casulli, A., Bart, J.M., Knapp, J. *et al.* (2009). Multi-locus microsatellite analysis supports the hypothesis of an autochthonous focus of *Echinococcus multilocularis* in northern Italy. *Int. J. Parasitol.* **39**(7): 837-842.
- Casulli, A., Szell, Z., Pozio, E. *et al.* (2010). Spatial distribution and genetic diversity of *Echinococcus multilocularis* in Hungary. *Vet. Parasitol.* **174**(3-4): 241-246.
- Conraths, F.J., Deplazes, P. (2015). *Echinococcus multilocularis*: Epidemiology, surveillance and state-of-the-art diagnostics from a veterinary public health perspective. *Vet. Parasitol.* **213**(3): 149-161.
- Corsini, M., Geissbuhler, U., Howard, J. *et al.* (2015). Clinical presentation, diagnosis, therapy and outcome of alveolar echinococcosis in dogs. *Vet. Rec* **177**(22): 569.
- Craig, P. (2003). *Echinococcus multilocularis*. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **16**(5): 437-444.
- Craig, P.S., Hegglin, D., Lightowers, M.W. *et al.* (2017). Echinococcosis: Control and Prevention. *Adv. Parasitol.* **96**: 55-158.
- Davidson, R.K., Romig, T., Jenkins, E. *et al.* (2012). The impact of globalisation on the distribution of *Echinococcus multilocularis*. *Trends Parasitol.* **28**(6): 239-247.
- Denzin, N., Schliephake, A., Frohlich, A. *et al.* (2014). On the move? *Echinococcus multilocularis* in red foxes of Saxony-Anhalt (Germany). *Transbound. Emerg. Dis.* **61**(3): 239-246.
- Deplazes, P., Eckert, J. (2001). Veterinary aspects of alveolar echinococcosis - a zoonosis of public health significance. *Vet. Parasitol.* **98**(1-3): 65-87.

- Deplazes, P., Rinaldi, L., Alvarez Rojas, C.A. *et al.* (2017). Global Distribution of Alveolar and Cystic Echinococcosis. *Adv. Parasitol.* **95**: 315-493.
- Dyachenko, V., Pantchev, N., Gawlowska, S. *et al.* (2008). *Echinococcus multilocularis* infections in domestic dogs and cats from Germany and other European countries. *Vet. Parasitol.* **157**(3-4): 244-253.
- Dybicz, M. *Echinococcus multilocularis* isolated from the human liver cyst in central Poland.
- Eckert, J., Deplazes, P. (2004). Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**(1): 107-135.
- Eckert, J., Friedhoff, K.T., Zahner, H. *et al.* (2008). Nachweis von Parasiten in Kotproben – Koproskopische Verfahren, *In*: Eckert, J., Friedhoff, K.T., Zahner, H., Deplazes, P. (Eds.) Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin. Enke Verlag, Stuttgart, pp. 513-517.
- Eckert, J., Gemmell, M.A., Meslin, F.-X. *et al.* (2001). WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a Public Health Problem of Global Concern.
- Eckert, J., Thompson, R.C. (2017). Historical Aspects of Echinococcosis. *Adv. Parasitol.* **95**: 1-64.
- EFSA (2015). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013. *EFSA J.* **13**(1): 3991.
- Enemark, H.L., Al-Sabi, M.N., Knapp, J. *et al.* (2013). Detection of a high-endemic focus of *Echinococcus multilocularis* in red foxes in southern Denmark, January 2013. *Euro Surveill.* **18**(10): 20420.
- Everitte, B.S., Landau, S., Leese, M. *et al.* (2011). Cluster Analysis, 5. Aufl. Wiley, Chichester.
- Federer, K., Armua-Fernandez, M.T., Hoby, S. *et al.* (2015). In vivo viability of *Echinococcus multilocularis* eggs in a rodent model after different thermo-treatments. *Exp. Parasitol.* **154**: 14-19.
- Fukunaga, M., Yokoyama, N., Ito, A. *et al.* Distribution of *Echinococcus multilocularis* in Hokkaido, Japan and its geographical migration.
- Geigy, C.A., Kuhn, K., Rutten, M. *et al.* (2013). Unusual presentation of alveolar echinococcosis as prostatic and paraprostatic cysts in a dog. *BMC Vet Res* **9**: 159.
- Gesy, K., Hill, J.E., Schwantje, H. *et al.* (2013). Establishment of a European-type strain of *Echinococcus multilocularis* in Canadian wildlife. *Parasitology* **140**(9): 1133-1137.
- Gesy, K.M., Jenkins, E.J. (2015). Introduced and Native Haplotypes of *Echinococcus multilocularis* in Wildlife in Saskatchewan, Canada. *J. Wildl. Dis.* **51**(3): 743-748.
- Gesy, K.M., Schurer, J.M., Massolo, A. *et al.* (2014). Unexpected diversity of the cestode *Echinococcus multilocularis* in wildlife in Canada. *Int. J. Parasitol.* **3**(2): 81-87.
- Haag, K.L., Zaha, A., Araujo, A.M. *et al.* (1997). Reduced genetic variability within coding and non-coding regions of the *Echinococcus multilocularis* genome. *Parasitology* **115**(5): 521-529.
- Hahn, C., Fromm, B., Bachmann, L. (2014). Comparative Genomics of Flatworms (Platyhelminthes) Reveals Shared Genomic Features of Ecto- and Endoparasitic Neodermata *Genome Biol. Evol.* **6**(5): 1105-1117.
- Hasegawa, M., Kishino, H., Yano, T. (1985). Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* **22**(2): 160-174.
- Hemphill, A., Stadelmann, B., Rufener, R. *et al.* (2014). Treatment of echinococcosis: albendazole and mebendazole – what else? *Parasite* **21**: 70.

- Hofer, S., Gloor, S., Muller, U. *et al.* (2000). High prevalence of *Echinococcus multilocularis* in urban red foxes (*Vulpes vulpes*) and voles (*Arvicola terrestris*) in the city of Zurich, Switzerland. *Parasitology* **120**(2): 135-142.
- Inukai, T., Yamashita, J., Mori, H. (1955). Most probable route of introduction of *Echinococcus* into the Island of Rebun. *J. Fac. Agric. Hokkaido Univ.* **50**(2): 134-139.
- Isaksson, M., Hagstrom, A., Armua-Fernandez, M.T. *et al.* (2014). A semi-automated magnetic capture probe based DNA extraction and real-time PCR method applied in the Swedish surveillance of *Echinococcus multilocularis* in red fox (*Vulpes vulpes*) faecal samples. *Parasites & Vectors* **7**: 583.
- Ito, A., Agvaandaram, G., Bat-Ochir, O.E. *et al.* (2010). Short Report: Histopathological, Serological, and Molecular Confirmation of Indigenous Alveolar Echinococcosis Cases in Mongolia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **82**(2): 266-269.
- Iwasaki, Y., Abe, T., Wada, K. *et al.* (2013). A Novel Bioinformatics Strategy to Analyze Microbial Big Sequence Data for Efficient Knowledge Discovery: Batch-Learning Self-Organizing Map (BLSOM). *Microorganisms* **1**(1): 137-157.
- Jenkins, E.J., Peregrine, A.S., Hill, J.E. *et al.* (2012). Detection of European Strain of *Echinococcus multilocularis* in North America. *Emerg. Infect. Dis.* **18**(6): 1010-1012.
- Jorgensen, P., an der Heiden, M., Kern, P. *et al.* (2008). Underreporting of human alveolar echinococcosis, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* **14**(6): 935-937.
- Jung, I., Kulldorff, M., Richard, O.J. (2010). A spatial scan statistic for multinomial data. *Stat. Med.* **29**(18): 1910-1918.
- Kapel, C.M., Torgerson, P.R., Thompson, R.C. *et al.* (2006). Reproductive potential of *Echinococcus multilocularis* in experimentally infected foxes, dogs, raccoon dogs and cats. *Int. J. Parasitol.* **36**(1): 79-86.
- Karamon, J., Sroka, J., Cencek, T. (2012). The first detection of *Echinococcus multilocularis* in slaughtered pigs in Poland. *Vet. Parasitol.* **185**(2-4): 327-329.
- Karas, M., Bahr, U. (1991). Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Mass. Spectrom. Rev.* **10**: 335-357.
- Karger, A. (2016). Current developments to use linear MALDI-TOF spectra for the identification and typing of bacteria and the characterization of other cells/organisms related to infectious diseases. *Proteomics Clin. Appl.* **10**(9-10): 982-993.
- Karger, A., Stock, R., Ziller, M. *et al.* (2012). Rapid identification of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* by intact cell Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation mass spectrometric typing. *BMC Microbiol.* **12**: 229.
- Karger, A., Ziller, M., Bettin, B. *et al.* (2011). Determination of Serotypes of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates by Intact Cell Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**(3): 896-905.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A. *et al.* (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* **28**(12): 1647-1649.
- Kedra, A.H., Swiderski, Z., Tkach, V.V. *et al.* (2000). Variability within NADH dehydrogenase sequences of *Echinococcus multilocularis*. *Acta Parasitol.* **45**(4): 353-355.
- Kern, P. (2010). Clinical features and treatment of alveolar echinococcosis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **23**(5): 505-512.
- Kern, P., Bardonnnet, K., Renner, E. *et al.* (2003). European Echinococcosis Registry: Human Alveolar Echinococcosis, Europe, 1982–2000. *Emerg. Infect. Dis.* **9**(3): 343-349.

- Kern, P., Menezes da Silva, A., Akhan, O. *et al.* (2017). The Echinococcoses: Diagnosis, Clinical Management and Burden of Disease. *Adv. Parasitol.* **96**: 259-369.
- Khalil, L.F., Jones, A., Bray, R.A. (1994). Order Cyclophyllidea (diagnosis and key to families), *In*: Keys to the cestode parasites of vertebrates. CAB International, Wallingford, U.K., pp. 305-307.
- Knapp, J., Bart, J.M., Giraudoux, P. *et al.* (2009). Genetic diversity of the cestode *Echinococcus multilocularis* in red foxes at a continental scale in Europe. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **3**(6): e452.
- Knapp, J., Bart, J.M., Glowatzki, M.L. *et al.* (2007). Assessment of Use of Microsatellite Polymorphism Analysis for Improving Spatial Distribution Tracking of *Echinococcus multilocularis*. *J. Clin. Microbiol.* **45**(9): 2943-2950.
- Knapp, J., Bart, J.M., Maillard, S. *et al.* (2010). The genomic *Echinococcus* microsatellite EmsB sequences: from a molecular marker to the epidemiological tool. *Parasitology* **137**(3): 439-449.
- Knapp, J., Damy, S., Brillaud, J. *et al.* (2017). EWET: Data collection and interface for the genetic analysis of *Echinococcus multilocularis* based on EmsB microsatellite. *PLoS. ONE* **12**(10): e0183849.
- Knapp, J., Gottstein, B., Saarma, U. *et al.* (2015). Taxonomy, phylogeny and molecular epidemiology of *Echinococcus multilocularis*: From fundamental knowledge to health ecology. *Vet. Parasitol.* **213**(3-4): 85-91.
- Knapp, J., Guislain, M.H., Bart, J.M. *et al.* (2008). Genetic diversity of *Echinococcus multilocularis* on a local scale. *Infect. Genet. Evol.* **8**(3): 367-373.
- Knapp, J., Staebler, S., Bart, J.M. *et al.* (2012). *Echinococcus multilocularis* in Svalbard, Norway: microsatellite genotyping to investigate the origin of a highly focal contamination. *Infect. Genet. Evol.* **12**(6): 1270-1274.
- Kohonen, T. 2001. Self-Organizing Maps. In Springer Series in Information Sciences (Berlin Springer), 502 S.
- Kohonen, T. (2013). Essentials of the self-organizing map. *Neural Netw.* **37**: 52-65.
- Konyaev, S.V., Yanagida, T., Ingovatova, G.M. *et al.* (2012). Molecular identification of human echinococcosis in the Altai region of Russia. *Parasitol. Int.* **61**(4): 711-714.
- Konyaev, S.V., Yanagida, T., Nakao, M. *et al.* (2013). Genetic diversity of *Echinococcus* spp. in Russia. *Parasitology* **140**(13): 1637-1647.
- Kulldorff, M. (1997). A spatial scan statistic. *Commun. Stat. Theory Methods* **26**(6): 1481-1496.
- Liccioli, S., Catalano, S., Kutz, S.J. *et al.* (2012). Sensitivity of double centrifugation sugar fecal flotation for detecting intestinal helminths in coyotes (*Canis latrans*). *J. Wildl. Dis.* **48**(3): 717-723.
- Lymbery, A.J. (2017). Phylogenetic Pattern, Evolutionary Processes and Species Delimitation in the Genus *Echinococcus*. *Adv. Parasitol.* **95**: 111-145.
- Ma, J.Y., Wang, H., Lin, G.H. *et al.* (2012). Molecular identification of *Echinococcus* species from eastern and southern Qinghai, China, based on the mitochondrial *cox1* gene. *Parasitol. Res.* **111**(1): 179-184.
- Maksimov, P., Zerweck, J., Dubey, J.P. *et al.* (2013). Serotyping of *Toxoplasma gondii* in Cats (*Felis domesticus*) Reveals Predominance of Type II Infections in Germany. *PLoS. ONE* **8**(11).
- Mathis, A., Deplazes, P., Eckert, J. (1996). An improved test system for PCR-based specific detection of *Echinococcus multilocularis* eggs. *J. Helminthol.* **70**(3): 219-222.
- McManus, D.P. (2013). Current status of the genetics and molecular taxonomy of *Echinococcus* species. *Parasitology* **140**(13): 1617-1623.
- Melssen, W., Wehrens, R., Buydens, L. (2006). Supervised Kohonen networks for classification problems. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **83**(2): 99-113.

- Miller, A.L., Olsson, G.E., Sollenberg, S. *et al.* (2016). Support for targeted sampling of red fox (*Vulpes vulpes*) feces in Sweden: a method to improve the probability of finding *Echinococcus multilocularis*. *Parasites & Vectors* **9**: 613.
- Moks, E., Saarma, U., Valdmann, H. (2005). *Echinococcus multilocularis* in Estonia. *Emerg. Infect. Dis.* **11**(12): 1973-1974.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S. *et al.* (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **51**(1): 263-273.
- Nakao, M., Lavikainen, A., Yanagida, T. *et al.* (2013). Phylogenetic systematics of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae). *Int. J. Parasitol.* **43**(12-13): 1017-1029.
- Nakao, M., Li, T., Han, X. *et al.* (2010). Genetic polymorphisms of *Echinococcus* tapeworms in China as determined by mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Int. J. Parasitol.* **40**(3): 379-385.
- Nakao, M., McManus, D.P., Schantz, P.M. *et al.* (2007). A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. *Parasitology* **134**: 713-722.
- Nakao, M., Sako, Y., Ito, A. (2003). Isolation of polymorphic microsatellite loci from the tapeworm *Echinococcus multilocularis*. *Infect. Genet. Evol.* **3**(3): 159-163.
- Nakao, M., Xiao, N., Okamoto, M. *et al.* (2009). Geographic pattern of genetic variation in the fox tapeworm *Echinococcus multilocularis*. *Parasitol. Int.* **58**(4): 384-389.
- Nakao, M., Yokoyama, N., Sako, Y. *et al.* (2002). The complete mitochondrial DNA sequence of the cestode *Echinococcus multilocularis* (Cyclophyllidae: Taeniidae). *Mitochondrion* **1**(6): 497-509.
- Oines, O., Isaksson, M., Hagstrom, A. *et al.* (2014). Laboratory assessment of sensitive molecular tools for detection of low levels of *Echinococcus multilocularis*-eggs in fox (*Vulpes vulpes*) faeces. *Parasites & Vectors* **7**: 246.
- Oksanen, A., Siles-Lucas, M., Karamon, J. *et al.* (2016). The geographical distribution and prevalence of *Echinococcus multilocularis* in animals in the European Union and adjacent countries: a systematic review and meta-analysis. *Parasites & Vectors* **9**: 519.
- Pacella, M., Grieco, A., Blaco, M. (2016). On the Use of Self-Organizing Map for Text Clustering in Engineering Change Process Analysis: A Case Study. *Comput Intell Neurosci*: Art-ID 5139574.
- Possenti, A., Busani, L., Boue, F. *et al.* 2015. GP/EFSA/AHAW/2012/01: *Echinococcus multilocularis* infection in animals.
- Rausch, R. (1953). The Taxonomic Value and Variability of certain structures in the cestode genus *echinococcus* (Rudolphi, 1801) and a Review of Recognized Species. In Thapar Commemoration Volume, 233-246.
- Rausch, R. (1954). Studies on the helminth fauna of Alaska. XX. The histogenesis of the alveolar larva of *Echinococcus* species. *J. Infect. Dis.* **94**(2): 178-186.
- Rausch, R., Schiller, E.L. (1954). Studies on the helminth fauna of Alaska. XXIV. *Echinococcus sibiricensis* n. sp., from St. Lawrence Island. *J. Parasitol.* **40**(6): 659-662.
- Rausch, R., Yamashita, J. (1957). Occurance of *Echinococcus multilocularis* Leukart, 1863, in Japan. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* **24**(2): 128-133.
- Rausch, V.R., Rausch, R.L. (1981). The karyotype of *Echinococcus multilocularis* (Cestoda: Taeniidae). *Can. J. Genet. Cytol.* **23**(1): 151-154.
- Rinder, H., Rausch, R.L., Takahashi, K. *et al.* (1997). Limited range of genetic variation in *Echinococcus multilocularis*. *J. Parasitol.* **83**(6): 1045-1050.
- Robert Koch-Institut. (2014). Echinokokkose, In: Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2013. RKI, Berlin, pp. 72-76.

- Robert Koch-Institut. (2017). Echinokokkose, In: Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2016. RKI, Berlin, pp. 67-70.
- Romig, T., Deplazes, P., Jenkins, D. *et al.* (2017). Ecology and Life Cycle Patterns of *Echinococcus* Species. *Adv. Parasitol.* **95**: 213-314.
- Romig, T., Dinkel, A., Mackenstedt, U. (2006). The present situation of *echinococcosis* in Europe. *Parasitol. Int.* **55**(Suppl.): S187-S191.
- Rommel, M., Eckert, J., Kutzer, E. *et al.* (2000). Veterinärmedizinische Parasitologie, 5. vollst. Neubearb. Aufl. Parey, Berlin.
- Saarma, U., Jogisalu, I., Moks, E. *et al.* (2009). A novel phylogeny for the genus *Echinococcus*, based on nuclear data, challenges relationships based on mitochondrial evidence. *Parasitology* **136**(3): 317-328.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**(12): 5463-5467.
- Satho, M., Nakaya, K., Nakao, M. *et al.* (2005). *Echinococcus multilocularis* confirmed on Kunashiri Island, 15 kilometers from the eastern part of Hokkaido, Japan (Short Report). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **72**(3): 284-288.
- Schurer, J.M., Gesy, K.M., Elkin, B.T. *et al.* (2014). *Echinococcus multilocularis* and *Echinococcus canadensis* in wolves from western Canada. *Parasitology* **141**(2): 159-163.
- Siles-Lucas, M., Casulli, A., Conraths, F.J. *et al.* (2017). Laboratory Diagnosis of *Echinococcus* spp. in Human Patients and Infected Animals. *Adv. Parasitol.* **96**: 159-257.
- Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P.K. *et al.* (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiol.* **6**: 791.
- Snabel, V., Georgescu, S.O., Nakao, M. *et al.* Genetic categorization and variation of *Echinococcus* in central-eastern Europe (Romania, Hungary).
- Tackmann, K., Loschner, U., Mix, H. *et al.* (1998). Spatial distribution patterns of *Echinococcus multilocularis* (Leuckart 1863) (Cestoda : Cyclophyllidae : Taeniidae) among red foxes in an endemic focus in Brandenburg, Germany. *Epidemiol. Infect.* **120**(1): 101-109.
- Tackmann, K., Loschner, U., Mix, H. *et al.* (2001). A field study to control *Echinococcus multilocularis*-infections of the red fox (*Vulpes vulpes*) in an endemic focus. *Epidemiol. Infect.* **127**(3): 577-587.
- Tackmann, K., Mattis, R., Conraths, F.J. (2006). Detection of *Echinococcus multilocularis* in foxes: evaluation of a protocol of the intestinal scraping technique. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* **53**(8): 395-398.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N. *et al.* (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* **28**(10): 2731-2739.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D. *et al.* (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**(12): 2725-2729.
- Tappe, D., Frosch, M. (2007). Rudolf Virchow and the Recognition of Alveolar *Echinococcosis*, 1850s. *Emerg. Infect. Dis.* **13**(5): 732-735.
- Tappe, D., Kern, P., Frosch, M. *et al.* (2010). A hundred years of controversy about the taxonomic status of *Echinococcus* species. *Acta Trop.* **115**(3): 167-174.
- Tappe, D., Weise, D., Ziegler, U. *et al.* (2008). Brain and lung metastasis of alveolar *echinococcosis* in a refugee from a hyperendemic area. *J. Med. Microbiol.* **57**(11): 1420-1423.
- Taylor, W.R. (1986). The classification of amino acid conservation. *J. Theor. Biol.* **119**(2): 205-218.
- Thompson, R.C. (2017). Biology and Systematics of *Echinococcus*. *Adv. Parasitol.* **95**: 65-109.



- Thompson, R.C., Kapel, C.M., Hobbs, R.P. *et al.* (2006). Comparative development of *Echinococcus multilocularis* in its definitive hosts. *Parasitology* **132**(5): 709-716.
- Thompson, R.C.A., Eckert, J. (1983). Observations on *Echinococcus multilocularis* in the Definitive Host. *Z. Parasitenkd.* **69**(3): 335-345.
- Thompson, R.C.A., Lymbery, A.J. (1995). *Echinococcus* and Hydatid Disease. CAB International, Wallingford.
- Törönen, P., Kolehmainen, M., Wong, G. *et al.* (1999). Analysis of gene expression data using self-organizing maps. *FEBS Lett.* **451**(2): 142-146.
- Trachsel, D., Deplazes, P., Mathis, A. (2007). Identification of taeniid eggs in the faeces from carnivores based on multiplex PCR using targets in mitochondrial DNA. *Parasitology* **134**(6): 911-920.
- Tsai, I.J., Zarowiecki, M., Holroyd, N. *et al.* (2013). The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature* **496**(7443): 57-63.
- Umhang, G., Knapp, J., Hormaz, V. *et al.* (2014). Using the genetics of *Echinococcus multilocularis* to trace the history of expansion from an endemic area. *Infect. Genet. Evol.* **22**: 142-149.
- Umhang, G., Lahoreau, J., Hormaz, V. *et al.* (2016). Surveillance and management of *Echinococcus multilocularis* in a wildlife park. *Parasitol. Int.* **65**(3): 245-250.
- Valot, B., Knapp, J., Umhang, G. *et al.* (2015). Genomic characterization of EmsB microsatellite loci in *Echinococcus multilocularis*. *Infect. Genet. Evol.* **32**: 338-341.
- Veit, P., Bilger, B., Schad, V. *et al.* (1995). Influence of environmental factors on the infectivity of *Echinococcus multilocularis* eggs. *Parasitology* **110**(1): 79-86.
- Virchow, R. (1856). Die multiloculäre, ulcerirende Echinokokkengeschwulst der Leber. *Verhandlungen der Physikalisch-Medizinischen Gesellschaft zu Würzburg* **6**: 84-95.
- Vispo, M., Ehrlich, R. (1994). Estudio de la expresion del gen con homeobox EgHbx2 del parassito *Echinococcus granulosus*. *II Jornadas de Investigacion del Grupo Montevideo*: 121.
- Vogel, H. (1955). Über den Entwicklungszyklus und die Artzugehörigkeit des europäischen Alveolarechinococcus. *Dtsch. Med. Wochenschr.* **80**(24): 931-932.
- Vuitton, D.A., Wang, Q., Zhou, H. *et al.* (2011). A historical view of alveolar echinococcosis, 160 years after the discovery of the first case in humans: part 1. What have we learnt on the distribution of the disease and on its parasitic agent? *Chin. Med. J.* **124**(18): 2943-2953.
- Wahlström, H., Comin, A., Isaksson, M. *et al.* (2016). Detection of *Echinococcus multilocularis* by MC-PCR: evaluation of diagnostic sensitivity and specificity without gold standard. *Infect. Ecol. Epidemiol.* **6**: 30173.
- Wahlström, H., Enemark, H.L., Davidson, R.K. *et al.* (2015). Present status, actions taken and future considerations due to the findings of *E. multilocularis* in two Scandinavian countries. *Vet. Parasitol.* **213**(3-4): 172-181.
- Wang, J.B., Delabie, J., Aasheim, H.C. *et al.* (2002). Clustering of the SOM easily reveals distinct gene expression patterns: results of a reanalysis of lymphoma study. *BMC Bioinformatics* **3**: 36.
- Wehrens, R., Buydens, L.M.C. (2007). Self- and Super-organizing Maps in R: The kohonen Package. *J. Stat. Softw.* **21**(5): 1-19.
- Xiao, N., Qiu, J., Nakao, M. *et al.* (2003). Identification of *Echinococcus* species from a yak in the Qinghai-Tibet plateau region of China (Short Report). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **69**(4): 445-446.
- Xiao, N., Qiu, J.M., Nakao, M. *et al.* (2005). *Echinococcus shiquicus* n. sp., a taeniid cestode from Tibetan fox and plateau pika in China. *Int. J. Parasitol.* **35**(6): 693-701.

- Yamasaki, H., Nakao, M., Nakaya, K. *et al.* (2008). Genetic analysis of *Echinococcus multilocularis* originating from a patient with alveolar echinococcosis occurring in Minnesota in 1977. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **79**(2): 245-247.
- Yanagida, T., Lavikainen, A., Hoberg, E.P. *et al.* (2017). Specific status of *Echinococcus canadensis* (Cestoda: Taeniidae) inferred from nuclear and mitochondrial gene sequences. *Int. J. Parasitol.* **47**(14): 971-979.
- Yang, J.K., Jia, W.Z., Jing, T. Genetic Variation of *Echinococcus granulosus* and *Echinococcus multilocularis* from Three Provinces/Autonomous Regions in China.
- Yang, Y.R., Rosenzvit, M.C., Zhang, L.H. *et al.* (2005). Molecular study of *Echinococcus* in west-central China. *Parasitology* **131**(4): 547-555.
- Yang, Z. (1994). Maximum likelihood phylogenetic estimation from DNA sequences with variable rates over sites: Approximate methods. *J. Mol. Evol.* **39**(3): 306-314.
- Zhu, H., Liu, J. The Identification of Echinococcus Cysts from Different Areas of China by Molecular Biology Methods.

### Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, im Institut für Epidemiologie angefertigt.

Für die Bereitstellung des Themas, dieser Dissertation, die hilfreiche Unterstützung in theoretischen und praktischen Fragestellungen der Arbeit, für die entgegengebrachte Geduld und offene Tür, sowie die gute Betreuung während der gesamten Zeit der Bearbeitung dieses Themas möchte ich mich recht herzlich bei Herrn Prof. Dr. Franz Josef Conraths bedanken.

Zudem möchte ich mich bei Prof. Dr. Berit Jungnickel, Professorin für Zellbiologie am Zentrum für molekulare Biomedizin, für die Übernahme der Vertretung an der Fakultät der Biowissenschaften bedanken.

Herrn Prof. Dr. Andreas Henke danke ich für die Hilfe und Unterstützung bei fachlichen als auch persönlichen Problemstellungen im Zuge dieser Arbeit.

Besonderer Dank gebührt Dr. Pavlo Maksimov der mir sowohl bei R als auch in der Blechbüchse immer hilfreich zur Seite stand. Weiterhin danke ich Dr. Christoph Staubach für die Möglichkeit im APHAEA-Projekt mitwirken zu können und bei der Unterstützung bei den räumlichen Analysen dieser Arbeit.

Dr. Jenny Knapp und Prof. Dr. Bruno Gottstein möchte ich für die Bereitstellung der Schweizer DNA-Proben danken.

Herr Dr. Meixner danke ich, dass die Kapillarelektrophorese bei der Firma SMB durchgeführt werden konnten.

Ein ganz besonderer Dank möchte ich an alle jetzigen und ehemaligen Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Institutes für Epidemiologie, aus der Zeit in Wusterhausen als auch auf der Insel Riems richten. Sie haben mich während meiner Arbeit am Institut und auch danach immer Unterstützt und standen mir mit Rat und Tat zur Seite. Ohne die fachliche und persönliche Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Vielen lieben Dank an Viola, Ronald, Nicole, Stefan und Martin für eure Unterstützung bei der Literaturbeschaffung, Wilddatenbank, beim Erstellen von Karten oder wenn der Computer einfach mal wieder nicht so wollte wie ich es gerne gehabt hätte. Vielen Dank auch an Roswitha Mathis, Dr. Astrid Sutor und Sabine Schwarz für die Hilfe bei den Sektionen und besonders Roswitha für ihre Hilfe bei den Untersuchungen der

## Anhang

---

Fuchsdärme. Lieben Dank auch an Maya, Jana und Andreas die besonders bei mathematischen Fragestellungen immer gern für eine Diskussion zur Verfügung standen. Für die Hilfe und die schöne Zeit im Labor möchte ich mich auch bei Andrea, Gereon, Mareen, Sebastian und Deborah bedanken. Es war toll mit euch zusammen zu arbeiten.

Ein riesen großer Dank gebührt meiner Familie, meinem Freund und meinen Freunden die mit viel Geduld, Liebe, starken Nerven und trotz weiter Entfernung mich immer unterstützt und motiviert haben. Ohne euch hätte ich dies nicht geschafft. Vielen lieben Dank!

Ein Dank soll auch an die Jäger und Fuchse gerichtet sein, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Herzigen Dank an alle die durch die fachliche oder persönliche Unterstützung dazu beigetragen haben das ich meine Doktorarbeit fertigstellen konnte.

### Wissenschaftliche Beiträge

#### **Beiträge in Fachzeitschriften**

Maksimov, P., Schares, G., Press, S., Fröhlich, A., Basso, W., Herzig, M., Conraths, F.J, (2017). Comparison of different commercial DNA extraction kits and PCR protocols for the detection of *Echinococcus multilocularis* eggs in faecal samples from foxes. *Vet. Parasitol.* **237**: 83–93.

Herzig, M., Mattis, R., Staubach, Ch., Knapp, J.; Gottstein, B.; Conraths, F. J.. (2015) Molekulare Typisierung von *Echinococcus multilocularis*-Isolaten aus Deutschland. *KompaktVET: Kongress-Magazin für Fortbildungen in der Medizin* **5**: 2-3

Maksimov, P., Press, S., Herzig, M., Fröhlich, A., Schares, G., Conraths, F.J, (2015). Vergleich kommerzieller DNA-Extraktionskits : Nachweis von *Echinococcus multilocularis*-Eiern in Fuchskot. *KompaktVET: Kongress-Magazin für Fortbildungen in der Medizin* **5**: 6-7

#### **Tagungsbeiträge**

##### **Vorträge auf Fachtagungen**

Beitrag in: „Aktuelle Erkenntnisse aus der Veterinärparasitologie“ DVG-Parasitologie-Tagung, 08. - 10. 07. 2013, Gießen

Titel: Molecular typing of *Echinococcus multilocularis* isolates from Germany

Autor(in): Herzig, Mandy; Staubach, Ch.; Mattis, R.; Knapp, J.; Gottstein, B.; Conraths, F. J.

Beitrag in: 2nd Young Scientists - Symposium Friedrich-Loeffler-Institute, 21. – 24. 08. 2013, Jena

Titel: Molecular typing of *Echinococcus multilocularis* isolates from Germany

Autor(in): Herzig, Mandy; Mattis, R.; Staubach, Ch.; Knapp, J.; Gottstein, B.; Conraths, F. J.

## Anhang

---

Beitrag in: EWDA 2014: 11th European Wildlife Disease Association Conference,  
25. - 29. 08. 2014, Edinburgh

Titel: Molecular typing of *Echinococcus multilocularis* isolates from Germany

Autor(in): Herzig, Mandy; Staubach, Ch.; Mattis, R.; Knapp, J.; Gottstein, B.;  
Conraths, F. J.

Beitrag in: „Parasitologie und parasitäre Krankheiten“ DVG-Parasitologie-Tagung,  
29.06 - 01. 07. 2015, Stralsund

Titel: Molekulare Typisierung von *Echinococcus multilocularis*-Isolaten aus  
Deutschland

Autor(in): Herzig, Mandy; Staubach, Ch.; Mattis, R.; Knapp, J.; Gottstein, B.;  
Conraths, F. J.

Beitrag in: „Parasitologie und parasitäre Krankheiten“ DVG-Parasitologie-Tagung,  
29.06 - 01. 07. 2015, Stralsund

Titel: Vergleich kommerzieller DNA-Extraktionskits zum Nachweis von  
*Echinococcus multilocularis*-Eiern in Fuchskot

Autor(in): Maksimov, Pavlo; Press, S.; Herzig, M.; Fröhlich, A.; Schares, G.;  
Conraths, F. J.

### **Posterpräsentationen**

Beitrag in: First Consultation Workshop on "APHAEA harmonized Approaches in  
monitoring wildlife Population Health, And Ecology and Abundance" EMIDA  
ERANet Project "Meeting with External Partners", 27. – 28. 06. 2013, Brescia

Titel: Molecular typing of *Echinococcus multilocularis* isolates from Germany

Autor(in): Herzig, Mandy; Staubach, Ch.; Mattis, R.; Knapp, J.; Gottstein, B.;  
Conraths, F. J.

Beitrag in: National Symposium on Zoonoses Research, 19. – 20. 09. 2013, Berlin

Titel: Molecular typing of *Echinococcus multilocularis* isolates from Germany

Autor(in): Herzig, Mandy; Staubach, Ch.; Mattis, R.; Knapp, J.; Gottstein, B.;  
Conraths, F. J.

## Anhang

---

- Beitrag in: National Symposium on Zoonoses Research, 19. – 20. 09. 2013, Berlin  
Titel: An Epidemiologic Study of Canine Echinococcosis and Livestock Hydatidosis in the Sudan  
Autor(in): Abass, N.; Herzig, M.; Elfadil, A.A.; Conraths, F.J.
- Beitrag in: 3rd Young Scientists - Symposium Friedrich-Loeffler-Institute, 19. – 22. 08. 2014, Mariensee  
Titel: *Echinococcus multilocularis*: Prevalence and intensity of infection in juvenile and adult red foxes  
Autor(in): Herzig, Mandy; Tackmann, K.; Mattis, R.; Sutor, A.; Schwarz, S.; Fröhlich, A.; Conraths, F.J.
- Beitrag in: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, Tagung der DVG – Fachgruppe „Parasitologie und Parasitäre Krankheiten“, 30. 06. – 02. 07. 2014, Leipzig  
Titel: *Echinococcus multilocularis*: Befallsintensität und –Extensität bei juvenilen und adulten Rotfüchsen  
Autor(in): Herzig, Mandy; Tackmann, K.; Mattis, R.; Staubach, Ch.; Sutor, A.; Schwarz, S.; Conraths, F. J.
- Beitrag in: 3rd International: One Health Congress 13. 03. – 18. 08. 2015, Amsterdam  
Titel: Molecular Typing of *Echinococcus multilocularis* Isolates from Germany  
Autor(in): Herzig, Mandy; Tackmann, K.; Mattis, R.; Staubach, Ch.; Sutor, A.; Schwarz, S.; Conraths, F. J.

### **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die aktuelle Promotionsordnung der Fakultät für Biowissenschaften (vormals Biologisch-Pharmazeutische Fakultät) der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist.

Ich versichere, die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Folgende Personen haben mich bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt: Prof. Dr. Franz Josef Conraths, Prof. Dr. Andreas Henke, Dr. Christoph Staubach und Dr. Pavlo Maksimov.

Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde von mir nicht in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit der vorgelegten Dissertation stehen.

Die vorliegende Dissertation wurde noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht.

Ich habe weder früher noch gegenwärtig die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht.

Nauen, 25. September 2018

.....

Mandy Herzig